



**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Estudo da resistência de *Plasmodium falciparum* à artemisinina e  
derivados: desenvolvimento e implementação de testes *in vitro*  
para avaliação da viabilidade**

**Fernanda Ivanira Henriques Murtinheira**

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE  
EM BIOLOGIA MOLECULAR EM SAÚDE TROPICAL  
INTERNACIONAL**

**JANEIRO, 2016**



**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Estudo da resistência de *Plasmodium falciparum* à artemisinina e  
derivados: desenvolvimento e implementação de testes *in vitro*  
para avaliação da viabilidade**

**Fernanda Ivanira Henriques Murtinheira**

Licenciada em Matemática/Ciências da Natureza pela Escola Superior de Educação de Viseu

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do  
grau de Mestre em Ciências Biomédicas, realizada sob orientação científica da  
Investigadora Doutora Fátima Nogueira

**Orientadora:** Investigadora Doutora Fátima Nogueira do *Global Health and Tropical  
Medicine* (GHTM) Instituto de Higiene e Medicina Tropical  
**Coorientador:** Doutor Sebastião Rodrigues da Faculdade de Ciências Médicas  
Universidade Nova de Lisboa

**JANEIRO, 2016**



*Nós somos da matéria com que são feitos os sonhos.*

Shakespeare



**A todos os que acreditam  
e lutam diariamente por mim!**

12 de janeiro de 2016

**Ao meu filho, o meu projeto mais perfeito,  
a quem muitas vezes não pude dar a atenção merecida.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Pai do céu que com todo o amor e carinho fez brotar em mim sonhos e conduziu pelas estradas que os permitiram realizar! Obrigada Pai, pela força, coragem e luz que incutiste em mim para levar até ao fim mais esta empreitada da minha vida. Obrigada por teres colocado na minha vida as pessoas certas no momento certo! Pai, agradeço-Te por tudo o que sou e por tudo o que serei!

À minha orientadora, Professora Doutora Fátima Nogueira, pelo seu profissionalismo, competência, disponibilidade e acima de tudo pela sua confiança, apoio e estímulo que tanto me fizeram crescer cientificamente. É uma fonte de inspiração para que a cada dia me torne uma profissional cada vez melhor e mais competente.

Ao meu marido e à minha irmã que me encorajaram a dar o salto de fé que me conduziu até à concretização deste sonho. Obrigada por terem estado sempre presentes nos bons e maus momentos desta difícil jornada. Nuno, obrigada por toda a paciência, compreensão e amor.

Aos meus adorados e queridos pais, pelo amor e apoio incondicional que me faz ter forças para lutar e conquistar os meus objetivos sem nunca desistir!

Ao meu irmão por me escutar nos momentos "menos bons" e, à sua maneira, me dar o apoio e o empurrãozinho para seguir em frente.

À minha amiga Rosa, pela amizade e companheirismo que muitas vezes tornaram o caminho menos tortuoso. A nossa amizade é um dos melhores presentes deste mestrado.

A todos os meus familiares que de uma maneira ou de outra me ajudaram a tornar realidade este projeto.

Às grandes mulheres que estiveram e estão por trás de mim servindo de pilares para a edificação de uma pessoa cada vez melhor, mais forte e completa.

À Lis e ao Tiago pelo companheirismo e ajuda imprescindível no laboratório.

Aos meus colegas pelo carinho, amizade, apoio e momentos de descontração que tornaram o caminho mais leve!

A vós que silenciosamente me acompanham e fortalecem!

Certamente ficaram por mencionar muitas pessoas importantes, mas a todas deixo o meu muito obrigada!

## RESUMO

Malária ou paludismo é uma doença parasitária provocada por protozoários do género *Plasmodium* e transmitida por fêmeas de mosquitos do género *Anopheles*. Há cinco espécies de *Plasmodium* capazes provocar malária em humanos (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*), destas espécies as mais prevalentes são *P. falciparum* e *P. vivax*, e a mais letal é *P. falciparum*.

Apesar de a malária ser uma doença que se pode prevenir e tratar, esta continua a ter um impacto devastador na saúde mundial. De acordo com o World Malaria Report de 2015, cerca de 3.2 biliões de pessoas encontravam-se em risco de contrair malária. Em 2015, foram estimados 214 milhões de novos casos de malária e cerca de 438 000 mortes, a maioria em crianças com menos de 5 anos na África Subariana.

Tendo em conta a situação atual da malária, já foram delineadas campanhas que têm por objetivo a erradicação desta doença. Os estudos demonstram o aumento da resistência aos antimaláricos mais utilizados, incluindo a artemisinina e seus derivados. A rápida disseminação da resistência aos antipalúdicos tornou prioritária a vigilância da susceptibilidade dos parasitas aos fármacos. É crucial o desenvolvimento de metodologias inovadoras que facilitem uma avaliação rápida, eficaz e rigorosa do efeito dos fármacos e compostos sintéticos ou naturais, no ciclo e metabolismo de *Plasmodium*, para que possam ser delineadas estratégias que limitem a propagação da resistência e o desenvolvimento de novos compostos e vacinas.

Neste trabalho, padronizamos o uso do fluorímetro de microplacas e resazurina, para avaliar *in vitro* a viabilidade de *P. falciparum* quando sujeito a um pulso de seis horas de dihidroartemisinina. Este teste de susceptibilidade, de fácil execução, produz resultados quantitativos, rápidos e fiáveis, o que o torna uma alternativa eficaz ao ensaio RSA<sup>0-3h</sup>, uma vez que consegue ultrapassar a subjetividade e trabalho árduo, inerentes à observação de esfregaços corados com Giemsa, por dois ou mais microscopistas experientes que contabilizam parasitas viáveis.

**Palavras-chave:** *Plasmodium falciparum*, malária, artemisinina e derivados, resistência, viabilidade, resazurina, RSA<sup>0-3h</sup>, teste de susceptibilidade *in vitro*.

## ABSTRACT

Malaria is a parasitic disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium* and transmitted by mosquito females of genus *Anopheles*. There are five species of *Plasmodium* that are capable to causing malaria in humans (*P. falciparum* , *P. vivax* , *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*) , *P. falciparum* and *P. vivax* are the most prevalent species and *P. falciparum* is the most lethal .

Although malaria is a disease that can be prevented and treated, at the same time malaria continues to have a devastating impact on world health. According to the World Malaria Report 2015, about 3.2 billion people remain at risk of malaria. In 2015, there were an estimated 214 million new cases of malaria and 438 000 deaths. mostly of children under five years old in sub-Saharan Africa.

Given the current situation of malaria, they have been outlined campaigns which are focused on eradication of this disease. Studies have shown increased resistance to commonly used antimalarial drugs, including artemisinin and its derivatives. The fast spread of resistance to antimalarial became the surveillance of susceptibility of parasites to drugs a priority. It is crucial to the develop innovative methodologies which can favour fast, efficient and accurate evaluation of the effect of drugs and synthetic or natural compounds in the cycle and metabolism of *Plasmodium*, so they can be drawn strategies that limit the spread of resistance and the development of new compounds and vaccines.

In this study, we standardized microplate spectrophotometer and resazurin use to assess in vitro viability of *P. falciparum* when subjected to a pulse of six hours of dihydroartemisinin. This susceptibility test, easy to perform, produce quantitative, fast and reliable results, which makes it an effective alternative to RSA<sup>0-3h</sup> since it can overcome the subjectivity and hard work inherent in the observation of smears stained with Giemsa by two or more experienced microscopists that account viable parasites.

**Keywords:** *Plasmodium falciparum*, malaria, artemisinin and derivatives, Artemisinin resistance, viability, resazurin, RSA<sup>0-3h</sup>, pulse drug assay.

## Índice De Figuras

<b>Figura I-1 – Ciclo biológico de <i>Plasmodium spp.</i></b> (adaptado de (14). Representação da fase pré-eritrocítica e eritrocítica do parasita no hospedeiro vertebrado e fase sexual no mosquito <i>Anopheles</i> .....	3
<b>Figura I-2 - Estádios de desenvolvimento intraeritrocitário de <i>Plasmodium falciparum</i>.</b> <b>A</b> - fase de anel, a seta assinala um parasita com dupla cromatina; <b>B</b> - fase de trofozoíto; <b>C</b> - fase de esquizonte, a seta assinala um dos merozoítos; <b>D</b> - gametócito (Fotografias de microscopia de transmissão a partir de esfregaços de cultura corados com Giemsa, ampliação 1000X).....	4
<b>Figura I-3 – Metabolismo de <i>Plasmodium falciparum</i> na fase intraeritrocitária.</b> FV – vacúolo digestivo, PV – vacúolo parasitóforo. Adaptado de (22). .....	6
<b>Figura I-4 – Resistência de <i>P. falciparum</i> aos antimaláricos, distribuição mundial.</b> Adaptado de (1); SP, sulfadoxina+pirimetamina.....	12
<b>Figura I-5– Áreas do Sudeste Asiático onde se encontra descrita resistência à ARTs.</b> Adaptado de (2). .....	16
<b>Figura I-6 – Diferentes abordagens para avaliar a suscetibilidade aos fármacos antimaláricos.</b> Adaptado de (3). .....	18
<b>Figura I-7– Representação esquemática do RSA <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>.</b> Adaptado de (4). As microculturas de <i>P. falciparum</i> são expostas a 700 nM de DHA durante 6 horas, o meio com fármaco é substituído por meio de cultura sem fármaco e cultivadas durante 66 horas (5). No final da incubação são realizados esfregaços e dois microscopistas experientes contabilizam os parasitas viáveis.....	20
<b>Figura I-8 – Modelo da evolução mitocondrial durante o ciclo intraeritrocítico de <i>P. falciparum</i>.</b> <b>A</b> - Fase de anel, a mitocôndria é o organelo verde; <b>B</b> – trofozoíto, a mitocôndria começa a alongar-se através do citosol, frequentemente associa-se com a membrana plasmática. <b>C, D e E</b> - Durante a esquizogonia a mitocôndria ramifica-se. <b>F</b> - A divisão mitocondrial parece ocorrer logo antes da divisão celular, ficando cada merozoíto filho com uma pequena mitocôndria. N-núcleo. Adaptado de (6) .....	22
<b>Figura III-1 – Representação esquemática do ensaio para a determinação da concentração e do tempo de incubação para fluorescência ótima da resazurina. ...</b>	34

<b>Figura IV-1 - Cultura de <i>P. falciparum</i> após o processo de sincronização.</b> Os esfregaços foram corados com Giemsa (Ampliação 1000 x). As setas indicam anéis com idade < 3 horas.....	40
<b>Figura IV-2 – Representação esquemática do ensaio de suscetibilidade RSA<sup>0-3h</sup> adaptado otimizado.</b> .....	41
<b>Figura IV-3 – Morfologia dos parasitas após 72 horas de incubação com e sem DHA.</b> Ampliação 1000 x. <b>A</b> - controlo sem DHA, a seta indica a hemozoína; <b>B</b> - 6 horas de exposição a 700 nM de DHA, <b>B1</b> - anel; <b>B2</b> - formas picnóticas inviáveis.....	42
<b>Figura IV-4 – Eritrócitos parasitados com <i>P. falciparum</i> e corados com JC-1.</b> Culturas tratadas com 700 nM de DHA durante 6 horas ( <b>C</b> e <b>D</b> ) e culturas não tratadas( <b>A</b> e <b>B</b> ), foram incubadas com 5 µM de JC-1 durante 30 minutos a 37°C. Após a adição de DAPI foram preparadas lâminas que foram observadas a fresco em microscópio ótico de fluorescência. <b>A</b> - trofozoíto, <b>B</b> - esquizonte, <b>C</b> - trofozoíto, <b>D</b> - forma picnótica. As setas indicam mitocôndrias ativas, com fluorescência vermelha. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole); JC-1 vermelho, ~590 nm; JC-1verde, ~525 nm; LV, luz visível. ....	43
<b>Figura IV-5 – Quantificação de parasitas após 72 horas de incubação com e sem DHA por intensidade de fluorescência de SYBR Green I e microscopia ótica.</b> <b>A</b> - intensidade de fluorescência de SGI em parasitas tratados com DHA 700nM (quadrados) e no controlo sem fármaco (bolas abertas). Representados os três ensaios cada um com 6 réplicas. <b>B</b> - Percentagem de sobrevivência calculada por microscopia ótica (MO) ( $P\% \text{ DHA} / P\% \text{ C} \times 100$ ), barra branca e por fluorescência de SGI ( $RFUs_{DHA} / RFUs \text{ C} \times 100$ ), barra cinzenta. ....	44
<b>Figura IV-6 - Otimização das condições de ensaio com Rh123.</b> <b>A</b> - Reta de regressão linear e correspondente $r^2$ da intensidade de fluorescência, para parasitas da estirpe 3D7 de <i>P. falciparum</i> em estágio de anel, para diferentes parasitémias. <b>B</b> - Indicadores da performance da incubação com Rh123 em dois ensaios distintos (n=3). $r^2$ – coeficiente de determinação; $Z'$ - fator de desempenho; S/B – signal to background ratio; S/N - signal to noise ratio. ....	46
<b>Figura IV-7 – Quantificação de parasitas após 72 horas de incubação com e sem DHA por intensidade de fluorescência de Rh123 e microscopia ótica.</b> <b>A</b> -	



intensidade de fluorescência de Rh123 em parasitas tratados com DHA 700nM (quadrados) e no controlo sem fármaco (bolas abertas). Representados os três ensaios cada um com 6 réplicas. **B** - Percentagem de sobrevivência calculada por microscopia ótica (MO) ( $P\%DHA/P\% C \times 100$ ) (barra branca) e por fluorescência de Rh123 ( $RFUsDHA/RFUs C \times 100$ ) (barra cinzenta)..... 47

**Figura IV-8 – Incubação com resazurina: linha de regressão linear e correspondente  $r^2$  da intensidade de fluorescência, para parasitas da estirpe 3D7 de *P. falciparum* em estágio de anel, ao longo de seis horas e para diferentes parasitémias. A** - Indicadores da performance da incubação com 2,5  $\mu$ M de RZN e parasitémia 0% - 2,5%; **B** - Indicadores da performance da incubação com 5  $\mu$ M de RZN e parasitémia 0% - 2,5%; **C** - Indicadores da performance da incubação com 10  $\mu$ M de RZN e parasitémia 0% - 2,5%; **D** - Indicadores da performance da incubação com 10  $\mu$ M de RZN e parasitémia 0% - 8%. ..... 49

**Figura IV-9 – Curva dose – resposta em função do logaritmo das diferentes doses de RZN e  $IC_{50}$  para a estirpe 3D7 de *P. falciparum*.** ..... 51

**Figura IV-10 – Concentração inibitória da CQ para *P. falciparum*.** Curvas dose resposta representativas, obtidas através do ensaio de suscetibilidade com RZN (linha negra) e SGI (linha cinzenta). **A** – estirpe 3D7; **B** – estirpe Dd2; **C** – média do  $IC_{50}$  determinada através da intensidade de fluorescência emitida pela RZN e SGI, de ensaios realizados em dias diferentes,  $\pm$  desvio padrão (SD). Foram realizados 2 ensaios independentes para cada estirpe. CQ – cloroquina; RZN – resazurina; SGI – SYBR Green I. .... 52

## Índice De Tabelas

<b>Tabela I-1 – Comparação entre os testes mais comuns de suscetibilidade <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> a antimaláricos. Adaptado de (84). .....</b>	<b>19</b>
<b>Tabela IV-1 – Comparação dos valores de sobrevivência obtidos para três métodos diferentes .....</b>	<b>47</b>
<b>Tabela IV-2 – Incubação com resazurina. Indicadores da performance da incubação com diferentes concentrações de resazurina e parasitêmias, ao longo de 6 horas.....</b>	<b>50</b>
<b>Tabela IV-3 – Comparação da % de sobrevivência calculada através da intensidade de fluorescência de RZN e por MO, para as estirpes 3D7 e 1240 de <i>P. falciparum</i>. .....</b>	<b>53</b>

## ABREVIATURAS

**ACTs** – terapias combinadas à base de artemisinina

**ART** – artemisinina

**ARTs** – artemisinina e derivados

**AQ** - amodiaquina

**CQ** – cloroquina

**DAPI** - 4',6-diamidino-2-phenylindole

**Dd2** – clone de *P. falciparum* resistente à cloroquina

**DHA** – dihidroartemisinina

**dhfr** - dihydrofolate reductase

**dhps** - dihydropteroate synthase

**DNA** – deoxyribonucleic acid

**FDA** - Food and Drug Administration

**Fe<sup>2+</sup>-PPIX** - ferroprotoporfirina IX

**Fe<sup>3+</sup>-PPIX** - ferriprotoporfirina

**FV** – vacúolo digestivo

**G6PD** - glucose-6-fosfato

**HRP2** - proteína rica em histidina 2

**HTC** - hematócrito

**JC-1** - 5,50,6,60-tetrachloro-1,10,3,30 tetraethyl benzimidazolo carbocyanine iodide

**Keap1** - kelch-like ECH associated protein 1

**LDH** - lactato desidrogenase

**MEF** – mefloquina

**MF** – microscopia de fluorescência

**MO** – microscopia ótica

**Nrf2** - nuclear factor erythroid 2-related factor 2

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PBS** - Solução Phosphate Buffered Saline

***P. falciparum*** – *Plasmodium falciparum*

***pfcr1*** - *P. falciparum* chloroquine-resistance transporter gene

**PfK13** - proteína kelch13 de *P. falciparum*

***pfmdr1*** - *P. falciparum* multidrug-resistance gene 1

**PI3K** - fosfatidilinositol-3-quinase

**PI3P** - fosfatidilinositol-3-fosfato

***P. knowlesi*** – *Plasmodium knowlesi*

***P. malariae*** – *Plasmodium malariae*

**PQ** – primaquina

**PV** – vacúolo parasitário

***P. vivax*** – *Plasmodium vivax*

**PVM** – membrana do vacúolo parasitário

**QN** – quinino

**RBCs** – eritrócitos

**Rh123** – rodamina 123

**ROS** – espécies reativas de oxigénio

**RPMIc** - meio de cultura RPMI completo

**RSA**<sup>0-3h</sup> – ring survival assay 0-3 hours

**RZN** - resazurina

**SIG** – SYBR Green I

**SP** - sulfadoxina + pirimetamina

**S/B** - signal to background ratio

**S/N** - signal to noise ratio

**$\lambda$**  - comprimento de onda

**$\Delta\Psi_m$**  - potencial de membrana mitocondrial

**1240** - clone de *P. falciparum* resistente à artemisinina

**3D7** – clone de *P. falciparum* sensível à cloroquina

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE TABELAS .....	XVI
ABREVIATURAS.....	XVII
<b>I- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Malária .....</b>	<b>2</b>
1.1 Situação atual da malária no mundo.....	2
1.1.1 Ciclo biológico do parasita <i>Plasmodium spp</i> .....	3
1.1.2 Aspetos relevantes do metabolismo de <i>Plasmodium falciparum</i> na fase intraeritrocitária ....	5
1.2 Tratamento da malária .....	7
<b>2. Aspetos metabólicos de <i>Plasmodium falciparum</i> associados à suscetibilidade a antimaláricos .....</b>	<b>8</b>
2.1 - Fármacos antimaláricos.....	8
2.1.1 Artemisinina e derivados .....	9
2.1.2 Mecanismo de ação da artemisinina e derivados.....	10
2.2 Resistência aos fármacos antimaláricos .....	12
2.2.1 Mecanismos de resistência .....	13
2.2.2 Mecanismo de resistência à artemisinina e derivados .....	14
2.2.3 Implicações da resistência aos antimaláricos .....	16
2.2.4 Detecção de resistência aos antimaláricos .....	17
2.2.5 Ring Survival Assay 0 – 3 horas (RSA <sup>0-3h</sup> ) .....	19
2.3 Detecção da viabilidade de <i>P. falciparum</i> .....	21
2.3.1 A mitocôndria de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	21
2.3.2 Corantes vitais fluorescentes .....	22
<b>II- OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>1. Objetivo Geral.....</b>	<b>25</b>

2. Objetivos Específicos .....	25
<b>III- MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
1. Meios de cultura e soluções .....	27
1.1 Meio de cultura RPMI completo (RPMIc) para <i>P. falciparum</i> .....	27
1.2 Solução Phosphate Buffered Saline (PBS).....	27
1.3 Sorbitol a 5% .....	27
1.4 Nycodenz.....	27
1.5 Giemsa a 20%.....	27
1.6 Dihidroartemisinina (DHA).....	27
1.7 Corantes celulares.....	27
2. Cultura de <i>P. falciparum</i> .....	28
2.1 Eritrócitos não parasitados .....	28
2.2 Descongelção de <i>P. falciparum</i> .....	28
2.3 Monitorização das culturas de <i>P. falciparum</i> .....	28
2.4 Sincronização de cultura, <i>in vitro</i> , de <i>P. falciparum</i> .....	29
2.5 Concentração de formas maduras de <i>P. falciparum</i> pelo método Nycodenz®. 29	
3. Otimização de teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> baseado no ensaio RSA <sup>0-3h</sup> .....	30
3.1 Sincronização das culturas .....	30
3.2 RSA <sup>0-3h</sup> adaptado .....	30
4. Avaliar a viabilidade de <i>P. falciparum</i> após exposição a DHA .....	31
4.1 Microscopia Ótica .....	32
4.2 Relação entre a viabilidade e a fluorescência de SYBR Green 1 .....	32
4.3 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) com JC-1 .....	32
4.4 Determinação da viabilidade mitocondrial com Rodamina 123 (Rh123) .....	33
4.5 Análise estatística .....	33

<b>5. Relação entre a viabilidade de <i>P. falciparum</i> e resazurina.....</b>	<b>34</b>
5.1 Determinação da concentração e do tempo de incubação para fluorescência ótima da resazurina para distinção de parasitêmias.....	34
5.2 Relação entre parasitêmia e fluorescência da resazurina .....	34
5.3 Análise estatística .....	35
5.4 Determinação do IC <sub>50</sub> da resazurina.....	36
5.5 Determinação do IC <sub>50</sub> da cloroquina para as estirpes 3D7 e Dd2 de <i>P. falciparum</i> com resazurina .....	36
5.6 Aplicação da resazurina para determinação da sobrevivência de <i>P. falciparum</i> .....	37
5.6.1 Determinação da percentagem de sobrevivência das estirpes 3D7 e 1240 de <i>P. falciparum</i> com resazurina .....	37
5.6.2 Análise estatística .....	38
<b>IV- RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>1. Otimização do teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> baseado no ensaio RSA0-3h... 40</b>	<b>40</b>
1.1 Sincronização das culturas .....	40
1.2 RSA <sup>0-3h</sup> adaptado .....	40
<b>2. Avaliação da sobrevivência de <i>P. falciparum</i> após exposição a DHA .....</b>	<b>41</b>
2.1 Avaliação da morfologia dos parasitas por Microscopia Ótica.....	42
2.2 Variação do potencial de membrana mitocondrial com JC-1 .....	42
2.3 Avaliação do desenvolvimento-divisão nuclear dos parasitas usando SYBR Green I .....	44
<b>3. Avaliação da viabilidade dos parasitas através do potencial de membrana mitocondrial.....</b>	<b>45</b>
3.1 Determinação da viabilidade com Rodamina 123.....	45
3.1.1 Avaliação da linearidade do sinal de fluorescência e o valor Z' do ensaio .....	45
<b>4. Avaliação da viabilidade dos parasitas através atividade metabólica .....</b>	<b>48</b>

4.1 Determinação da viabilidade com resazurina.....	48
4.1.1 Avaliação da linearidade do sinal de fluorescência e o valor $Z'$ do ensaio .....	48
4.1.2 Determinação do $IC_{50}$ da resazurina .....	51
4.1.3 Determinação do $IC_{50}$ da cloroquina para as estirpes 3D7 e Dd2 de <i>P. falciparum</i> com resazurina .....	51
4.2 Aplicação da resazurina para determinação da sobrevivência de <i>P. falciparum</i> .....	52
4.2.1 Determinação da percentagem de sobrevivência das estirpes 3D7 e 1240 de <i>P. falciparum</i> com resazurina .....	52
<b>V- DISCUSSÃO/ CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>VI- BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>58</b>
<b>VII- ANEXOS .....</b>	<b>70</b>



# **I- INTRODUÇÃO**

## 1. Malária

Malária ou paludismo é uma doença provocada pela infecção dos eritrócitos por protozoários do género *Plasmodium*. É transmitida ao hospedeiro vertebrado durante a refeição sanguínea de fêmeas do mosquito *Anopheles*. Este protozoário é um organismo eucariota unicelular pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Haematozoa, Ordem Haemosporida, Família Plasmodiidae e Género *Plasmodium*. Das cerca de 200 espécies do género *Plasmodium* 5 são capazes de infetar e causar doença em humanos, são elas, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi* e *P. falciparum*, (7–10) sendo esta última a espécie mais patogénica, podendo causar anemia grave, malária cerebral ou morte. As características da doença variam com a espécie infetante, a parasitémia, o estado imunitário do paciente, com a administração da terapêutica correta e com a suscetibilidade do parasita a esta. Cerca de metade da população mundial está em risco de contrair malária. Entre 2000 e 2015, a incidência da malária (a taxa de novos casos) decresceu cerca de 37% e a taxa de mortalidade devido a malária 60% globalmente (11).

O controlo da malária tem vindo a ser dificultado por muitos fatores, sendo os principais a resistência dos mosquitos vetores aos inseticidas e a emergência de estirpes de parasitas (nomeadamente *P. falciparum*) resistente aos fármacos antimaláricos. Sendo a resistência de *P. falciparum* aos sucessivos antimaláricos introduzidos um problema recorrente.

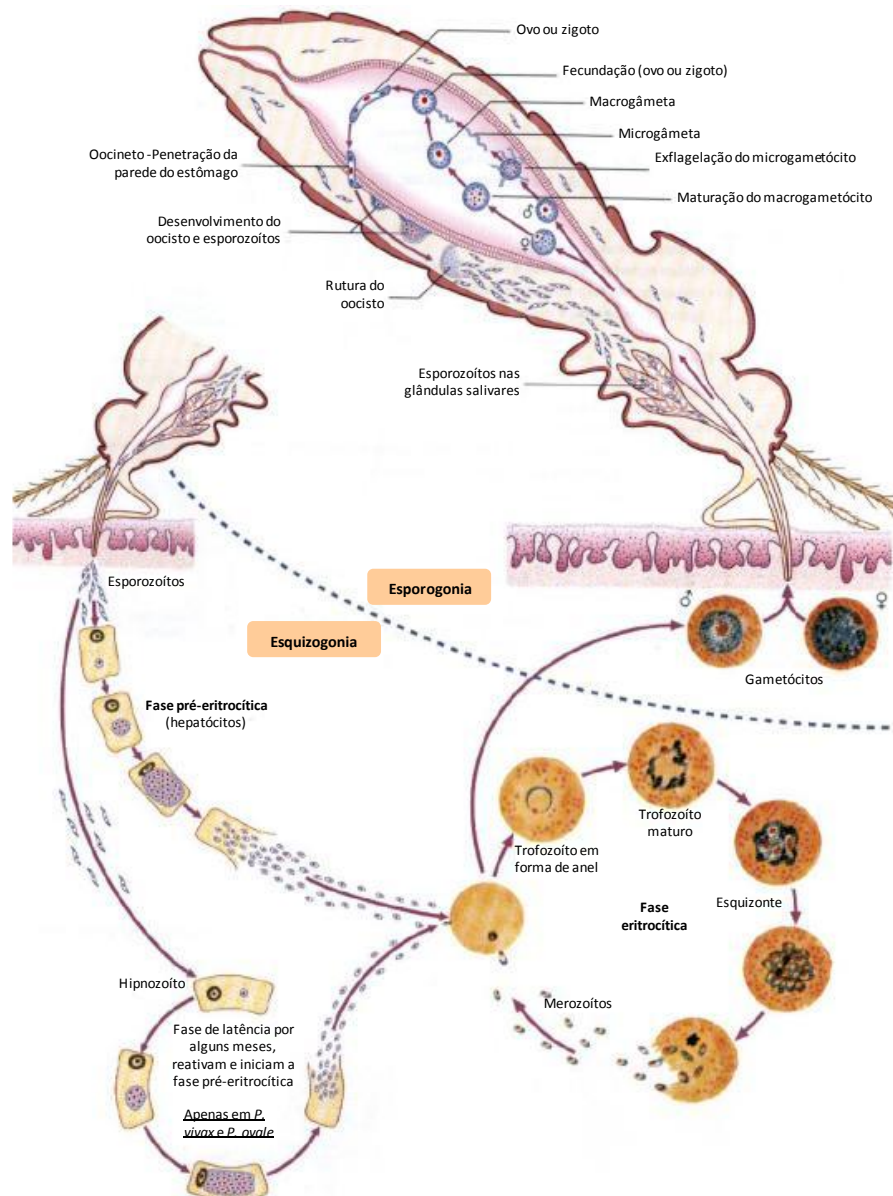
Atualmente a maior preocupação centra-se na emergência de estirpes de *P. falciparum* resistentes aos fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da malária, em 5 países da região do Mekong: Camboja, Laos, Mianmar, Tailândia e Vietname (12).

### 1.1 Situação atual da malária no mundo

De acordo com o World Malaria Report – 2015 publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de metade da população mundial encontra-se em risco de contrair malária. De acordo com as últimas estimativas, em 2015 foram registados cerca de 214 milhões de casos de malária que provocaram aproximadamente 438 000 mortes. A região mais afetada é o continente africano, onde se estima que tenham ocorrido 91% de todas as mortes por malária, sendo na sua maioria crianças com menos de 5 anos.

## 1.1.1 Ciclo biológico do parasita *Plasmodium* spp.

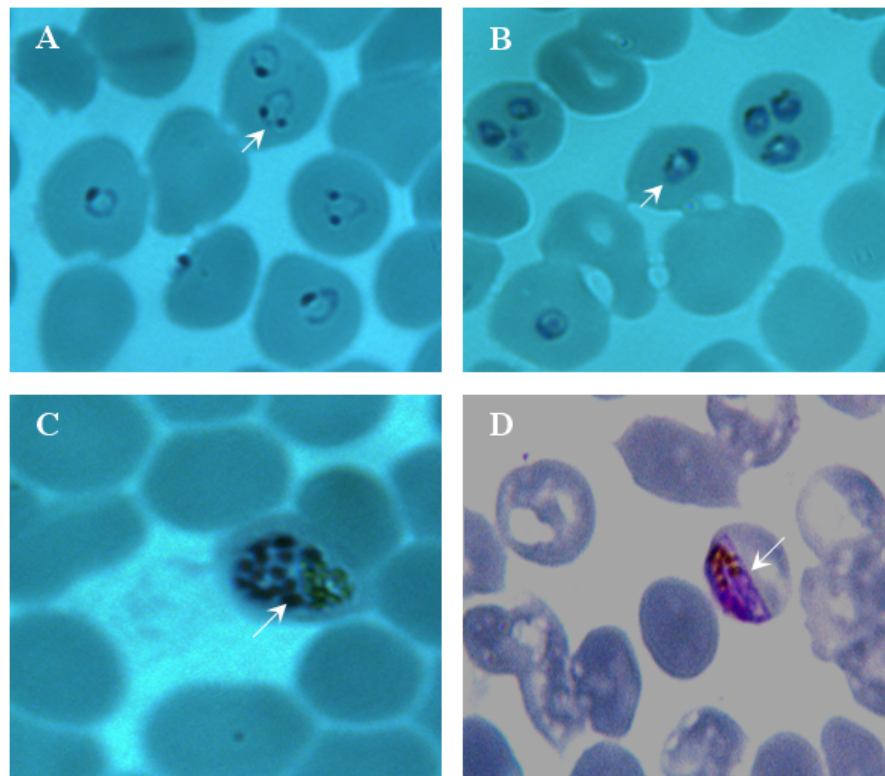
O parasitas do género *Plasmodium* são similares e apresentam um ciclo biológico com duas fases: esporogónica sexuada e esquizogónica assexuada (Figura I-1). A fase sexuada ocorre no mosquito. A fase esquizogónica desenvolve-se no hospedeiro vertebrado (7,13).



**Figura I-1 – Ciclo biológico de *Plasmodium* spp.** (adaptado de (14). Representação da fase pré-eritrocítica e eritrocítica do parasita no hospedeiro vertebrado e fase sexual no mosquito *Anopheles*.

## I- INTRODUÇÃO

Através da picada do mosquito, os esporozoítos são inoculados na derme e chegam à corrente sanguínea (15). Os esporozoítos migram para o fígado onde invadem os hepatócitos e se multiplicam assexuadamente (esquizogonia hepática), gerando milhares de merozoítos hepáticos (exoeritrocitários) que são libertados na corrente sanguínea. Nas espécies *P. vivax* e *P. ovale* alguns merozoítos sofrem esquizogonia, enquanto outros podem diferenciar-se em formas dormentes do parasita que ficam em estado de latência no fígado (hipnozoítos) (16) por períodos variáveis. A libertação dos merozoítos hepáticos para a circulação sanguínea ocorre através de estruturas designadas merossomas (17), que abandonam o fígado, entram em circulação e uma vez nos pulmões libertam os merozoítos iniciando-se a esquizogonia sanguínea ou intraeritrocitária (18).



**Figura I-2 - Estádios de desenvolvimento intraeritrocitário de *Plasmodium falciparum*.** **A** - fase de anel, a seta assinala um parasita com dupla cromatina; **B** - fase de trofozoíto; **C** - fase de esquizonte, a seta assinala um dos merozoítos; **D** - gametócito (Fotografias de microscopia de transmissão a partir de esfregaços de cultura corados com Giemsa, ampliação 1000X).

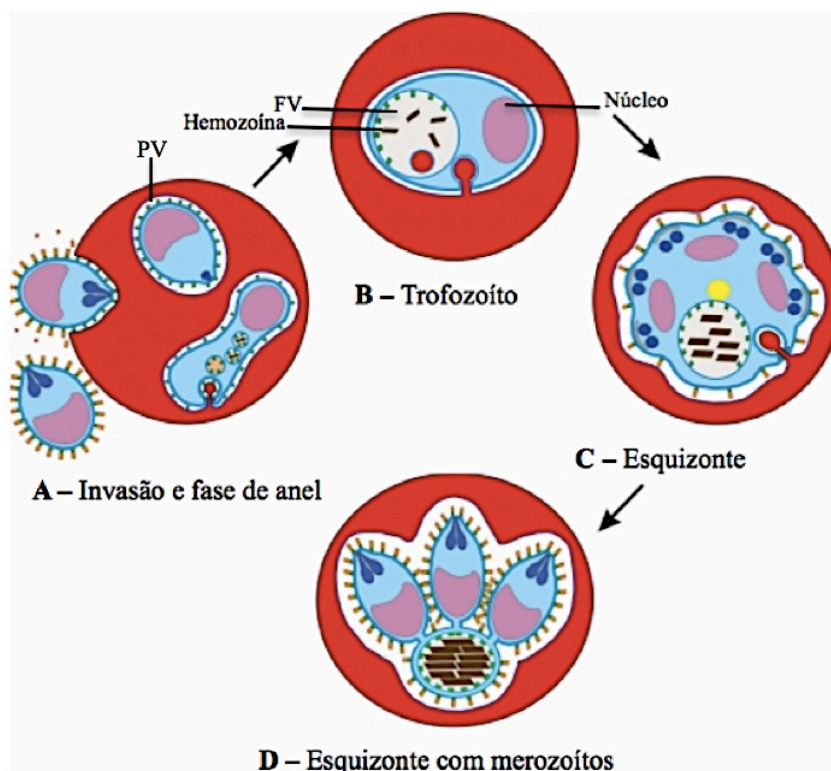
Durante a fase intraeritrocitária do parasita, os merozoítos sofrem diferenciação originando estádios de desenvolvimento: anel, trofozoíto e esquizonte (Figura I-2).

Após a invasão o parasita desenvolve-se dentro de um vacúolo parasitófaro (PV) iniciando a fase de anel (Figura I-3). Após 24-30 horas o parasita atinge a fase de trofozoíto, na qual aumenta de tamanho e inicia a replicação do DNA. Quando o núcleo entra em divisão, ocorre a esquizogonia, originando merozoítos - forma-se o esquizonte (cada esquizonte origina 16 a 32 merozoítos). Cerca de 48 horas após a invasão, ocorre a ruptura do eritrócito infetado libertando os merozoítos, que invadem novos eritrócitos (Figura I-3). Este ciclo ocorre de uma forma periódica de aproximadamente 48 h, sendo responsável pelos picos febris típicos de uma infecção de malária (7,13). Uma proporção dos merozoítos diferenciam-se em estádios sexuais (Figura I-2), gametócitos femininos e masculinos, as formas infetantes para os mosquitos vetores. Os gametócitos ingeridos pela fêmea do mosquito durante a refeição sanguínea, os gametócitos masculinos sofrem exflagelação no intestino médio do mosquito e fundem-se com o gâmeta feminino originando o zigoto - oocineto e aloja-se na parede intestinal do mosquito formando o oocisto. Este, por um processo de multiplicação esporogônica, dá origem aos esporozoítos, que são libertados na hemolinfa, migram até às glândulas salivares do mosquito, e podem ser transmitidos ao hospedeiro vertebrado na próxima refeição sanguínea do mosquito (7,19).

### ***1.1.2 Aspectos relevantes do metabolismo de Plasmodium falciparum na fase intraeritrocitária***

*P. falciparum* é um parasita intracelular obrigatório, que invade ativamente o eritrócito hospedeiro, onde se desenvolve no interior do vacúolo parasitófaro (PV) (Figura I-3) formado durante a invasão.

A invasão do eritrócito pelos merozoítos ocorre rapidamente ( $\approx 30$ s) (20). Após contato com um eritrócito, o merozoíto adere à membrana deste (21); penetra no eritrócito onde sofre desenvolvimento no interior de um compartimento chamado PV, formado a partir da membrana do eritrócito. A membrana que rodeia o merozoíto nesta fase, tem origem no eritrócito e toma o nome de membrana do vacúolo parasitófaro (PVM) (Figura I-3).



**Figura I-3 – Metabolismo de *Plasmodium falciparum* na fase intraeritrocitária.**

FV – vacúolo digestivo, PV – vacúolo parasitífero. Adaptado de (22).

A hemoglobina proveniente do eritrócito hospedeiro, é digerida no vacúolo digestivo (FV) do parasita (23). No FV as proteases degradam a hemoglobina (24,25), que constitui uma fonte necessária de aminoácidos, libertando espaço para o parasita se desenvolver e contribuindo para a manutenção da pressão osmótica no eritrócito (25). No entanto, a degradação da hemoglobina gera grandes quantidades de ferriprotoporfirina IX (FP-IX) e espécies reativas de oxigénio (ROS) (26). Os ROS danificam os ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e membranas (27). Ao contrário dos mamíferos, os quais destoxificam os grupos heme abrindo o anel enzimaticamente e por glucoronidação, o parasita digere a hemoglobina enzimaticamente produzindo heme livre [ ferriprotoporfirina IX (  $\text{Fe}^{2+}$  -PPIX ) ], que é tóxico para o parasita. O heme é oxidado e origina ferriprotoporfirina,  $\text{Fe}^{3+}$ -PPIX, que precipita no vacúolo digestivo do parasita produzindo uma matriz cristalina, não tóxica designada por hemozoína (pigmento malárico) (Figura I-3) (28,29).

### 1.2 Tratamento da malária

A malária é uma doença curável se diagnosticada e tratada adequada e prontamente (10). Na ausência de uma vacina eficaz contra a malária, o controlo da doença continua a ser realizado através do controlo dos mosquitos vetores e da administração de fármacos eficazes.

O principal objetivo do tratamento é eliminar rápida e completamente o parasita do sangue do doente de modo a: curar a infeção; prevenir a evolução da malária não grave para uma possível forma grave (malária grave e/ou malária cerebral) com desfecho fatal (30). A nível de saúde pública o tratamento visa reduzir a transmissão da infeção, diminuindo o reservatório infeccioso e prevenir o aparecimento e propagação da resistência a fármacos antimaláricos (31).

A identificação de resistência por parte de *P. falciparum* aos sucessivos antimaláricos introduzidos, conduziu à recomendação da OMS de não usar monoterapia no tratamento dos casos de malária não complicada por *P. falciparum*, preconizando apenas as terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs). Estes consistem na administração de um derivado da artemisinina em conjunto com um antimalárico de semivida mais prolongada (32).

O tratamento da malária não complicada recai sobretudo num número reduzido de fármacos em combinação com um derivado da artemisinina (33). A OMS recomenda tratamento da malária não complicada por *P. falciparum* (com exceção de crianças muito jovens e mulheres grávidas), com uma das seguintes ACTs:

Artemeter + Lumefantrina

Artesunato + Amodiaquina

Artesunato + Fansidar (SP)

Artesunato + Mefloquina

Dihidroartemisinina + Piperaquina

Artesunato + Pironaridina

### **2. Aspectos metabólicos de *Plasmodium falciparum* associados à suscetibilidade a antimaláricos**

Nesta secção, serão abordados os aspectos metabólicos do parasita, modos de ação e mecanismos inerentes à resistência aos antimaláricos, com especial destaque para os derivados da artemisinina.

#### **2.1 - Fármacos antimaláricos**

O quinino (QN), um alcalóide extraído da planta *Chinchona* e as 4-aminoquinolinas desenhadas com base na estrutura da sua molécula (cloroquina, amodiaquina, mefloquina e halofantrina), atuam sobretudo nos estádios intraeritrocitários trofozoítos e esquizontes. Este antimalárico forma complexos com a ferriprotoporfirina IX (produzidos durante a metabolização da hemoglobina no FV do parasita) evitando a polimerização da hemozoína, o que impede o parasita de fazer a destoxificação dos radicais livres (34,35). Atualmente é utilizado no tratamento da malária grave.

A cloroquina (CQ) foi considerada o fármaco perfeito devido à eficácia elevada contra formas eritrocitárias de *P. falciparum*, baixo custo e ausência de efeitos secundários. Este antimalárico foi utilizado extensivamente nas regiões endémicas durante 10 anos, após os quais surgiram as primeiras estirpes de *P. falciparum* resistentes na América do Sul, Ásia e África (36).

A primaquina (PQ) atua contra as formas exoeritrocíticas do parasita, incluindo os gametócitos. Este fármaco é tóxico para pacientes com deficiência em glucose-6-fosfato (G6PD) eritrocitária, provoca anemia hemolítica. No entanto, a deficiência em G6PD confere aos pacientes uma maior resistência à infeção por *P. falciparum* (37,38).

A combinação terapêutica de sulfadoxina e pirimetamina dois fármacos com uma semivida longa, bloqueia a síntese de ácidos nucleicos. Cerca de um ano após a sua introdução registaram-se falhas terapêuticas na Ásia, América do Sul e África. Na atualidade recorre-se à SP para o tratamento profilático de grávidas no 2º e 3º trimestres de gravidez (39,40).

A mefloquina (MEF) um 4 – quinolinometanol, similar ao QN, foi aprovada em 1989 pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento e prevenção da malária.



Este antimalárico tem um tempo de semivida longo, o que permite a administração de apenas uma dose semanal. Poucos anos após a sua introdução verificaram-se falhas terapêuticas resultantes da emergência de resistência dos parasitas à MEF, sobretudo no Sudeste Asiático (41).

A pironaridina é uma molécula baseada na estrutura da mepacrina com a adição de uma cadeia lateral semelhante à amodiaquina (AQ). Este fármaco é eficaz contra *Plasmodium falciparum*, incluindo estirpes resistentes a outros antimaláricos como a CQ. A resistência à pironaridina parece emergir lentamente e é retardada quando é usada em combinação com outros antimaláricos, em particular, o artesunato. Estudos indicam que existe um efeito sinérgico entre a artemisinina e a pironaridina contra parasitas resistentes a um ou ambos, o que permite a restauração de eficácia contra estas estirpes (42).

A planta Qinghao (*Artemisia*), foi testada em 1967 na China, e revelou uma grande atividade antimalárica. Em 1972, o composto ativo foi purificado e designado qinghaosu (essência de qinghao). Os derivados deste extracto, as artemisininas, são agora considerados os antimaláricos mais eficazes, sobretudo quando combinados com outros fármacos (43).

### **2.1.1 Artemisinina e derivados**

A artemisinina (ART), uma lactona sesquiterpénica, possui um grupo funcional endoperóxido, que demonstrou ser essencial para a sua atividade antimalárica (44,45). A partir da ART, foram obtidos outros derivados semissintéticos com maior potência antimalárica, como o artesunato e o arteméter (46).

Os derivados de ART apresentam como propriedades farmacológicas: redução rápida e sustentada da biomassa do parasita; eficazes contra parasitas resistentes a outros fármacos; resolução rápida dos sintomas clínicos; redução dos gametócitos; atuam em várias fases do ciclo do parasita (36). Estes fármacos podem ser administrados por diversas vias (oral, rectal, intravenosa, intramuscular), são muito bem tolerados e têm baixa toxicidade (47).

Como inconvenientes da ART podem ser referidos o fato de não apresentar atividade contra as formas exoeritrocitárias do parasita, o seu custo elevado e a sua curta semivida (<6h) que pode originar recrudescências quando utilizada em monoterapia. Outro fator limitante a ter em conta é que a ART apresenta baixa solubilidade em meio aquoso e lipídico. De modo a suprimir este inconveniente foram sintetizados a partir da dihidroartemisinina (DHA), o metabolito ativo da ART, o artemeter e o arteéter, fármacos mais lipossolúveis e o artesunato mais hidrossolúvel (46,47).

Dos antimaláricos, o artesunato é o mais rapidamente eficaz, devido à sua biodisponibilidade praticamente instantânea, uma vez é hidrolisado em DHA antes da sua absorção (48).

Os derivados da ART (ex.: artesunato, artemeter, arteéter e DHA) são rapidamente eliminados do organismo. Assim, o antimalárico companheiro nos ACTs deve possuir um tempo de semivida maior, de forma a eliminar os parasitas residuais. A terapia ACT tem ainda como vantagem reduzir a probabilidade de seleção de mutações que desencadeiem resistência simultânea a ambos os fármacos da combinação pois têm modos de ação diferentes (49).

### ***2.1.2 Mecanismo de ação da artemisinina e derivados***

Ao comparar a ART e seus derivados (ARTs) com outros antimaláricos verifica-se que agem mais rapidamente sobre o parasita, inibindo os seus principais processos metabólicos, como a glicólise e a síntese de ácidos nucleicos e proteínas, impedindo assim o desenvolvimento do parasita logo que este invade os eritrócitos. A ARTs atuam preferencialmente nos estádios de anel e trofozoíto jovem. Outra das vantagens da ARTs em relação aos restantes fármacos é a inibição da citoaderência dos parasitas às células endoteliais, um dos principais determinantes de virulência. Ao agir sobre a forma de anel, impedem o desenvolvimento de gametócitos, o que conduz à redução da transmissão de malária em áreas endémicas. A ARTs não atuam nos estádios hepáticos do parasita, pelo que não são adequados para o tratamento profilático, nem devem ser utilizados em monoterapia pois aumentam a probabilidade de ocorrer recrudescência (50,51).

## I- INTRODUÇÃO

Apesar de a ARTs serem utilizados há vários anos, o seu mecanismo de ação ainda não é consensual. A ponte endoperóxida (C-O-O-C) comum a todos estes compostos é o farmacóforo, que lhes confere as propriedades antimaláricas.

Para que se desencadeie o mecanismo de ação da ARTs, eles necessitam ser ativados, o que gera radicais livres. Foram propostos vários modelos para a fonte de ativação da ARTs, entre os quais a reação covalente entre a ART e o ferro ligado à hemoglobina (52–55) ou o  $\text{Fe}^{2+}$  - heme, que segundo Zhang e Gerhard é o ativador mais eficiente e rápido da artemisinina (56).

Há teorias que defendem que a redução da ponte endoperóxida pelo heme intraparasitário ou pelo ferro iónico, ou a sua protonação leva à formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) que provocam a morte do parasita (57).

Contudo, a integridade da ponte endoperóxida é necessária mas não suficiente para a atividade antimalárica, pelo que outros alvos, merecedores de mais estudos, têm sido propostos como contribuidores para o mecanismo de ação, tais como:

Retículo sarco-endoplasmático  $\text{Ca}^{2+}$ - ATPase (SERCA) codificado pelo gene *PfATP6* (55,58), que reduz o  $\text{Ca}^{2+}$  livre no citosol através do bombeamento de dois  $\text{Ca}^{2+}$  para o retículo endoplasmático, em troca de  $4\text{H}^+$ . A ARTs ligam-se a *PfATP6* provocando alterações conformacionais que impedem a ligação de  $\text{Ca}^{2+}$ , e consequentemente, a perda da função de bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  e morte do parasita (59).

O potencial da membrana mitocondrial pode ser interrompido devido às ROS geradas localmente pela ARTs, o que leva à despolarização da membrana mitocondrial e a falhas no funcionamento da mitocôndria (47,55,57,58,60–63).

Hartwig et al. (64), referem que a ARTs se acumulam rapidamente no vacúolo digestivo, onde são ativados pelo heme associado aos lípidos neutros, resultando metabolitos reativos que alquilizam o heme formando adutos lipofílico que provocam peroxidação lipídica e formação de ROS, que danificam as membranas lipídicas. Este mecanismo em parte explica os danos que ocorrem no FV (64–71).

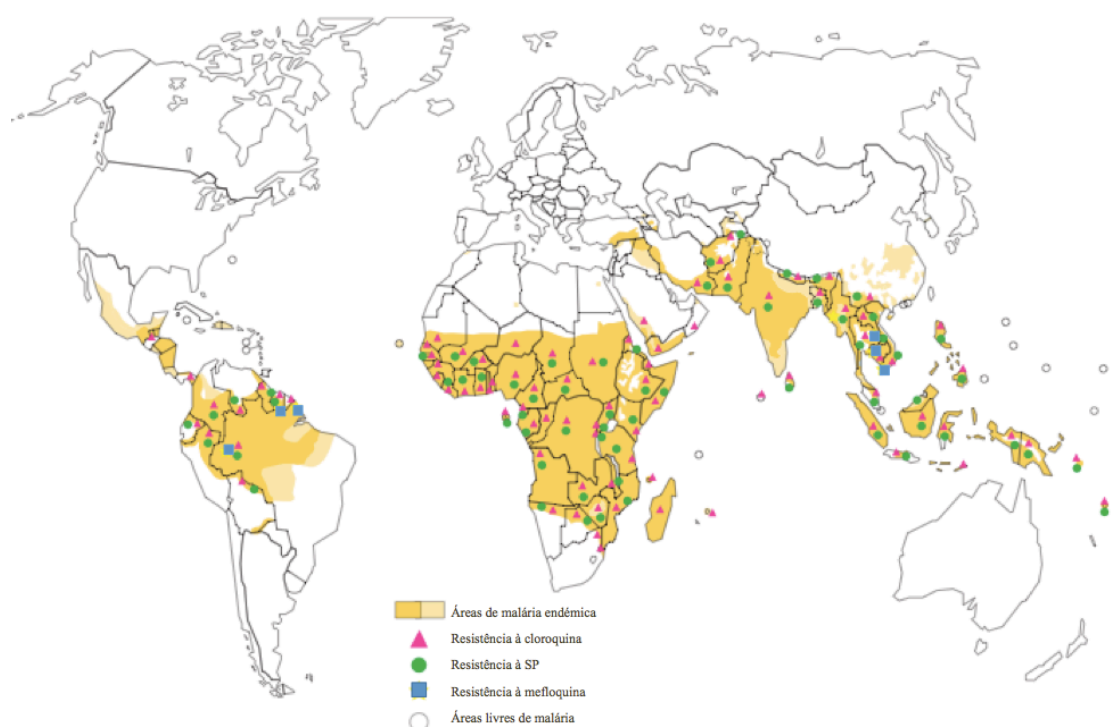
Danos na cadeia de DNA provocados pelo artesunato (dependentes da dose e do tempo de atuação) são acompanhados pelo aumento da produção de ROS no parasita, o que

por sua vez exacerba esses danos no DNA. Estas observações sugerem uma relação causal entre ROS, danos no DNA e morte do parasita (51).

## 2.2 Resistência aos fármacos antimaláricos

O controlo da malária atualmente tem como maior entrave a resistência (em especial) de *P. falciparum* aos antimaláricos (72).

Atualmente a resistência está documentada para todas as classes de antimaláricos (Figura I-4 e Figura I-5) e para três das espécies de *Plasmodium* que infetam humanos: *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*. Também há relatos de resistência cruzada aos antimaláricos. Vários antimaláricos foram removidos do mercados após a propagação da resistência do parasita (73).



**Figura I-4 – Resistência de *P. falciparum* aos antimaláricos, distribuição mundial.**  
Adaptado de (1); SP, sulfadoxina+pirimetamina.

A resistência aos antimaláricos surge sobretudo devido à demora ou falha na depuração das formas assexuadas do parasita no sangue, o que permite a formação de gametócitos

e conseqüentemente a transmissão do genótipo mutante (30).

Os genótipos mutantes resistentes aos antimaláricos surgem devido a eventos genéticos espontâneos. A resistência pode desenvolver-se a partir de uma única mutação ou através de vários eventos genéticos interligados. Num ambiente com doses subterapêuticas do fármaco, os parasitas susceptíveis são eliminados e o parasita resistente sobrevive, transmitindo a sua informação genética, o que conduz à propagação da resistência (31).

A resistência resulta da interação de diversos fatores inerentes ao parasita, aos hospedeiros vertebrado e invertebrado e ao próprio meio ambiente em que se desenvolve (74). Contudo, tem sido apontado como principal fator a pressão dos fármacos, ou seja, o uso inadequado dos fármacos ou o uso extensivo em monoterapia, que conduz à seleção de estirpes resistentes (75).

### **2.2.1 Mecanismos de resistência**

Os mecanismos genéticos de resistência de *P. falciparum* aos fármacos antimaláricos ainda não estão completamente esclarecidos. Foram identificados seis genes de *P. falciparum* envolvidos ou potencialmente envolvidos na resistência aos principais antimaláricos: os genes que codificam *dihydrofolate reductase (dhfr)*, *dihydropteroate synthase (dhps)*, *P. falciparum chloroquine-resistance transporter (pfcr1)*, *P. falciparum multidrug-resistance gene 1 (pfmdr1)*, *cytochrome b* e proteína *kelch13* de *P. falciparum (pfK13)*.

As mutações no gene *pfcr1* provocam alterações no transportador PfCRT que conferem resistência á CQ, por diminuir as concentrações do fármaco no interior do FV parasitário, devido ao seu efluxo (76).

O gene *pfmdr1* codifica uma glicoproteína transmembranar (homologa à Pgh1 humana) localizada no FV de *P. falciparum* (77). As estirpes do parasita resistentes à CQ, QN e AQ apresentam uma redução da concentração de fármaco no FV, devido à propensão reduzida do transportador PfMDR1 de ligar e transferir o antimalárico, o que não permite alcançar os níveis requeridos para a inibição da polimerização de heme (78,79).

Mutações múltiplas nos genes *dhfr* e *dhps* conduzem à alteração na forma do alvo (enzimas DHFR e DHPS) o que altera a afinidade de ligação aos fármacos proguanil e sulfadoxina-pirimetamina (78–80).

O citocromo *bc-1* é alvo do antimalárico atovacuona, usada principalmente na prevenção da malária (81,82). Mutações no gene *pfcytb* alteram o sítio de ligação da quinona ao fármaco conferindo resistência (79,83).

As mutações no gene *pfk13* provocam alterações na proteína K13 que estão associadas à entrada dos parasitas num estado de quiescência característico da resistência à ARTs.

### **2.2.2 Mecanismo de resistência à artemisinina e derivados**

Inicialmente a OMS definiu resistência à ART como “o aumento do tempo de depuração parasitária após tratamento com artesunato em monoterapia ou ACTs”. Até à data a OMS considera que existe apenas uma resistência parcial uma vez que apenas são afetados parasitas na fase de trofozoíto imaturo (anel) (12).

A resistência de *P. falciparum* aos ACTs está associada a mutações na proteína kelch13 codificada pelo gene *pfK13* (Pf 3D7\_1343700) (84). A presença de mutações neste gene está correlacionada com o aumento da percentagem de sobrevivência *in vitro* e do tempo de depuração *in vivo* (84–87). As mutações no gene *pfk13* introduzem alterações conformacionais na proteína kelch13, permitindo aos parasitas resistir aos efeitos letais do stress oxidativo provocado pela ARTs e alterar a regulação genética do ciclo celular, através de uma resposta proteica, fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/ fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) e de fatores de transcrição ainda não determinados. Todo este processo envolve o metabolismo de ácidos gordos na mitocôndria e no apicoplasto com gastos energéticos reduzidos (88,89).

A função exata de PfK13 em *Plasmodium* ainda não está totalmente esclarecida, esta proteína pertence à família kelch na qual se inclui a proteína humana Keap1 (*kelch-like ECH associated protein 1*). É possível estabelecer analogias funcionais entre PfK13 e a proteína Keap1 humana, em particular, na resposta celular ao stress oxidativo (84).

A proteína Keap1 é um repressor do fator de transcrição Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). Em condições basais o complexo Keap1-Nrf2 leva à

poliubiquitinação de Nrf2 mediada pelo complexo ligase *Cullin3*, que promove a degradação proteossomal de Nrf2. Em condições de stress, alterações conformacionais de Keap1 limitam a ligação com Nrf2, que deixa de ser degradado e é translocado para o núcleo, onde controla a expressão de genes envolvidos na manutenção do equilíbrio redox intracelular. O complexo Keap1-Nrf2 regula a resposta citoprotetora ao stress provocado por ROS. Assume-se que PfK13 desempenhe uma função semelhante em *Plasmodium* (90).

As mutações em PfK13 alteram a conformação e a função biológica da proteína impedindo a interação com outras proteínas (84).

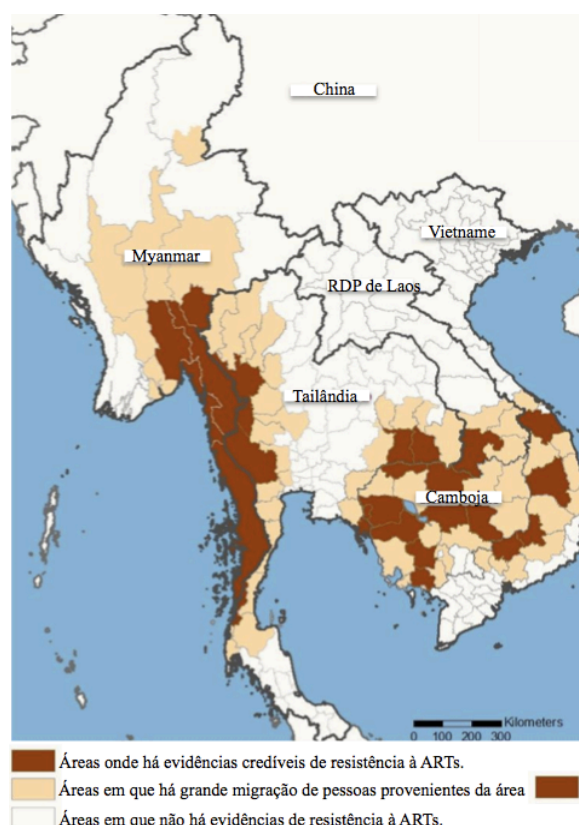
Mbengue e colaboradores (89) descrevem que mutações em PfK13 conferem resistência à ARTs através do aumento da estabilidade e concentração da enzima PfPI3K, e consequentemente da concentração de PI3P, um lípido sinalizador importante na exportação de proteínas do retículo endoplasmático do parasita para o eritrócito hospedeiro (89). A enzima PfPI3K liga-se a PfK13, sofre poliubiquitinação e proteólise. Nos parasitas resistentes, a mutação C580Y de PfK13 diminui a ligação a PfPI3K ao domínio kelch, diminuindo assim a sua ubiquitinação e degradação, o que permite o aumento da concentração de PI3P (89,91). PI3P é associado a alterações na célula hospedeira e a funções do apicoplasto e do vacúolo digestivo, bem como com a sobrevivência do parasita através das vias de reparação de DNA, transcricional e redox, que também se encontram relacionadas com a resistência à ARTs (89).

Perante os dados PI3P surge como o mediador da resistência à ARTs, PfPI3K como um alvo importante para a eliminação da malária e PfK13 como marcador molecular da resistência à ARTs (84,88,89).

A identificação do marcador molecular de resistência à ARTs baseado em mutações do gene *pfk13* permitiu à OMS reformular a definição de resistência, tendo sido incluídas informações sobre o genótipo do parasita. Assim sendo, a atual definição de resistência à ARTs inclui não só o tempo aumentado de depuração dos parasitas como a presença de mutações no gene *pfk13* associadas à resistência (12). Esta não é uma definição definitiva, uma vez que a lista de mutações associadas à resistência à artemisinina está constantemente a ser atualizada.

### 2.2.3 Implicações da resistência aos antimaláricos

A resistência aos antimaláricos está documentada para todas as classes de fármacos, incluindo a ARTs. Os últimos relatórios da OMS dão conta do aparecimento de resistência de *P. falciparum* à ARTs no Sudeste Asiático, sendo agora prevalente em regiões do Camboja, República Democrática Popular de Laos, Myanmar, Tailândia e Vietname (Figura I-5). Não está descrita há evidência de resistência à ARTs fora dessas áreas (92).



**Figura I-5— Áreas do Sudeste Asiático onde se encontra descrita resistência à ARTs. Adaptado de (2).**

Os ACTs constituem a última alternativa eficaz para a terapia da malária. A disseminação da resistência a estes fármacos conduzirá ao aumento das taxas de morbidade e mortalidade, e simultaneamente afetará os programas de erradicação e gestão clínica de áreas endêmicas (93).



A resistência aos fármacos antimaláricos tem consequências a nível económico uma vez que aumentam os custos associados ao tratamento dos pacientes, à aquisição de redes mosquiteiras, absentismo ao trabalho, controlo dos vetores, instalações de saúde, educação e investigação (39).

A administração de ACTs tem como principal vantagem, o fato de a ARTs eliminarem os parasitas circulantes no estágio de anel, garantindo assim uma resposta terapêutica mais eficaz e rápida (92). A uma depuração parasitária mais lenta associa-se uma maior taxa de falência terapêutica e um maior risco de desenvolver gametocitêmia, aumentando a probabilidade de transmissão de fenótipos tolerantes à ARTs (86,94). Este é um fator de grande importância na saúde pública, pois o efeito das artemisininas em reduzir o nível de gametocitêmia é crucial nos seus efeitos benéficos no controlo e transmissão da malária (95). Outro aspeto relevante é que o fármaco parceiro fica sujeito a uma pressão seletiva maior, o que pode levar ao aumento do nível de resistência (92).

### **2.2.4 Detecção de resistência aos antimaláricos**

A rápida disseminação da resistência aos fármacos antimaláricos nas últimas décadas tem aumentado a necessidade de uma melhor monitorização do surgimento de resistência aos medicamentos, de modo a assegurar uma boa gestão dos casos clínicos, permitir a detecção precoce de alterações dos padrões de resistência, e sugerir as áreas a serem revistas nas políticas nacionais de tratamento da malária (96) .

Atualmente estão disponíveis essencialmente três metodologias para monitorizar a suscetibilidade de *P. falciparum* aos fármacos antimaláricos (Figura I-6):

**i) estudos de eficácia terapêutica (*in vivo*).** Os ensaios clínicos permitem uma avaliação direta da resposta ao tratamento em pacientes com malária, mas fornecem pouca informação sobre a suscetibilidade intrínseca dos parasitas ao fármaco.

**ii) os testes *in vitro*** [ ex.: ensaio de maturação de esquizontes da OMS, ensaios isotópicos e os ensaios colorimétricos baseados na lactato desidrogenase do parasita (pLDH) e na proteína rica em histidina 2 (HRP2) ] permitem uma avaliação quantitativa

da suscetibilidade ao fármaco num ambiente controlado, independente do sistema imunológico do paciente e pode fornecer dados essenciais para os ensaios clínicos.

iii) **identificação de marcadores moleculares**, como o PCR ou PCR em tempo real, pode oferecer perspectivas interessantes para o futuro e detectar fatores inerentes à resistência aos fármacos (96). Os testes com intercalantes de DNA e o uso de fluoróforos, são sensíveis, relativamente simples e rápidos, e não necessitam de equipamento especializado. Estes métodos são uma boa alternativa aos testes de suscetibilidade aos antimaláricos, já que permitem obter resultados quantitativos e reproduzíveis num curto período de tempo (97).

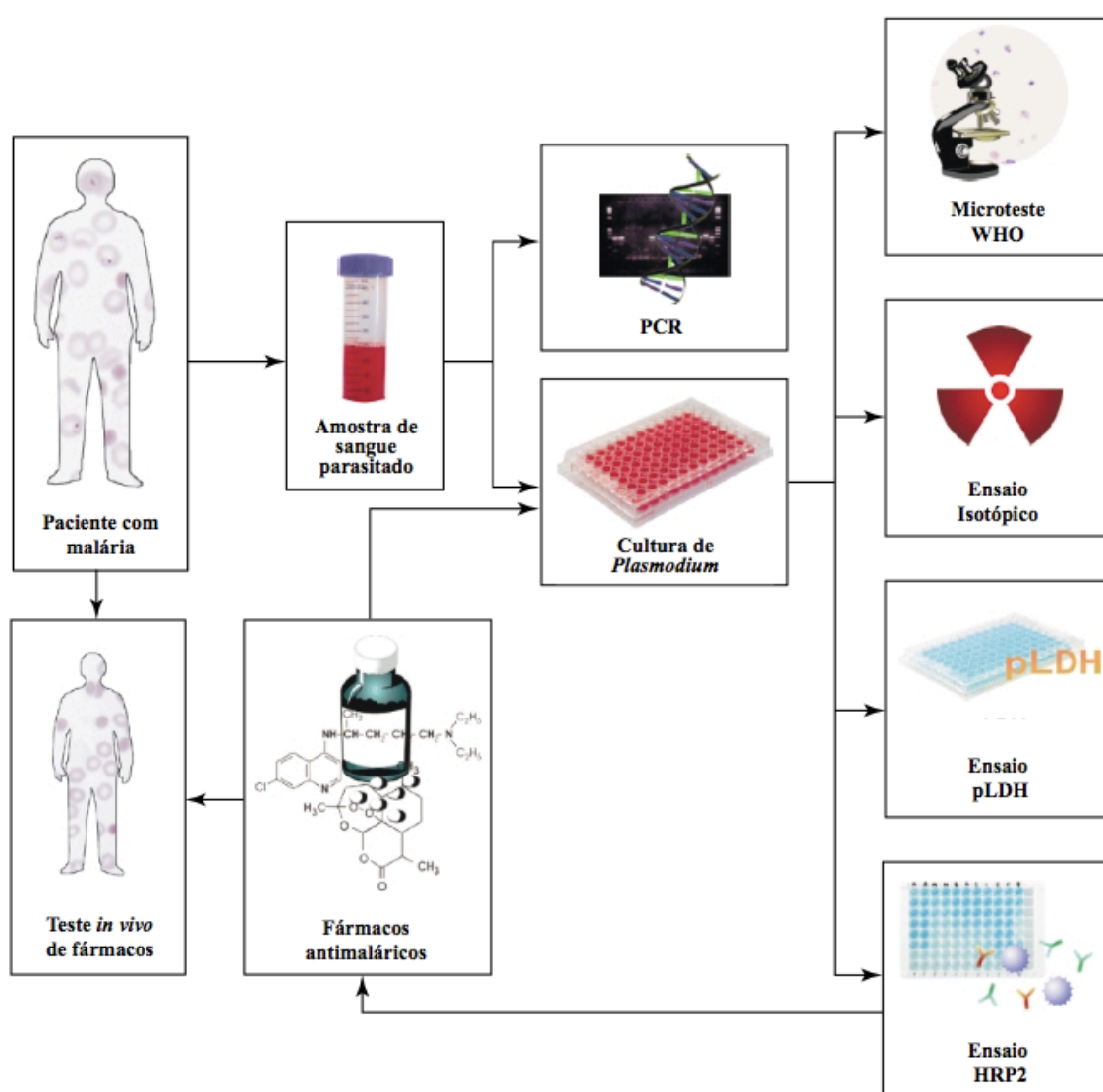


Figura I-6 – Diferentes abordagens para avaliar a suscetibilidade aos fármacos antimaláricos. Adaptado de (3).

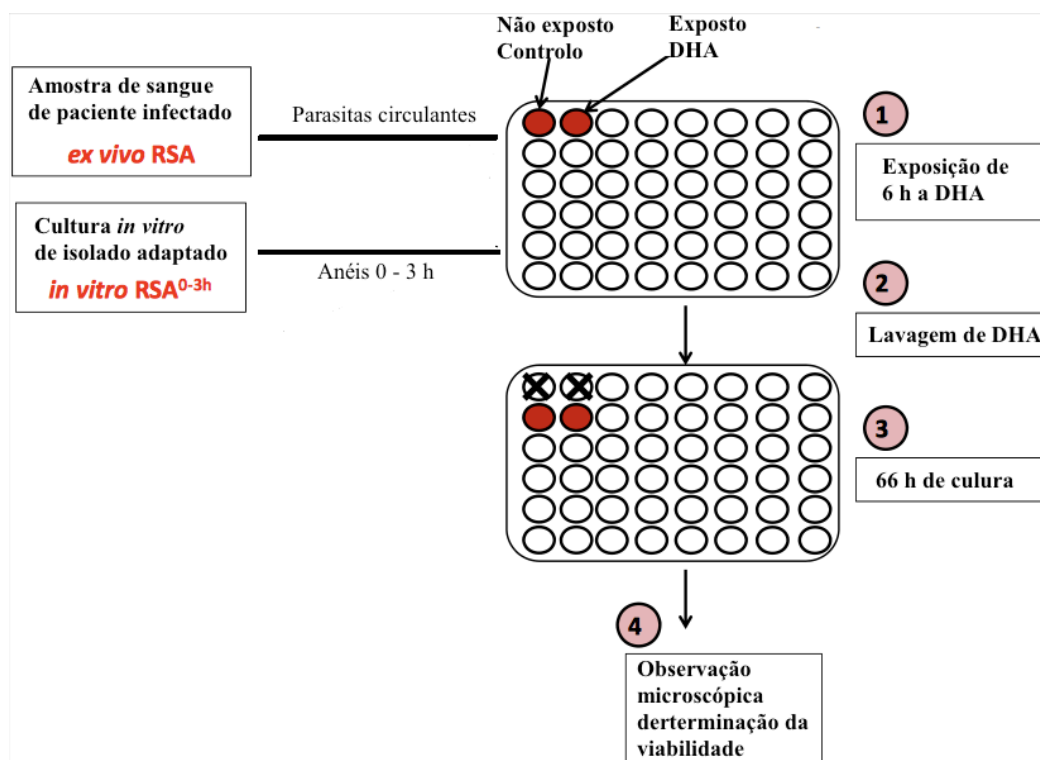
**Tabela I-1 – Comparação entre os testes mais comuns de suscetibilidade *in vitro* de *P. falciparum* a antimaláricos. Adaptado de (97).**

	MARKIII da OMS	Ensaio isotópico	Ensaio pLDH*	Ensaio HRP2**	Intercalantes de DNA
<b>Sensibilidade</b>	alta	moderada	baixa	alta	alta
<b>Tempo de cultura</b>	24 h	48 h (até 72 h)	48 h	48 – 72 h	48 h
<b>Parasitemia inicial</b>	0,6 – 0,8%		0,5%	0,01 – 0,1%	0,05 – 0,8%
<b>Avaliação da inibição do crescimento</b>	Microscopia (morfológicos, maturação de esquizontes)	Incorporação de precursores radiomarcados	Atividade enzimática de pLDH	ELISA	Fluorescência
<b>Necessidade de equipamento</b>	Reduzida (microscópio)	Elevada (contador de cintilação)	Moderada (leitor de microplaca)	Moderada (leitor de microplaca)	Moderada (fluorímetro)
<b>Tempo dispendido</b>	Elevada	Reduzida	Reduzida	Reduzida	Reduzida

\*pLDH lactato desidrogenase de *Plasmodium*; \*\* HRP2 proteína rica em histidina 2 de *Plasmodium*

### 2.2.5 Ring Survival Assay 0 – 3 horas (RSA<sup>0-3h</sup>)

Apesar da resistência de *P. falciparum* à ARTs já estar confirmada *in vivo*, os testes de suscetibilidade *in vitro* tradicionais para cálculo da concentração inibitória (ex. IC<sub>50</sub>) de 48 ou 72 horas não revelam resultados correspondentes na suscetibilidade *in vitro*, o que os torna pouco eficazes para monitorização epidemiológica da resistência à ARTs (98). Face a esta situação foi desenvolvido o *Ring Survival Assay 0-3 horas* (Figura I-7). Para este ensaio, parasitas no estágio de anel com menos de 3 horas após-invasão (RSA<sup>0-3h</sup>) obtidos de culturas altamente sincronizadas são expostos a 700 nM de DHA, concentração correspondente à pressão de fármaco exercida sobre os parasitas durante o tratamento de um paciente (4). A percentagem de sobrevivência é calculada através do rácio entre parasitas viáveis na cultura exposta a DHA e os viáveis na cultura controlo (5).



**Figura I-7– Representação esquemática do RSA *in vivo* e *in vitro*.** Adaptado de (4). As microculturas de *P. falciparum* são expostas a 700 nM de DHA durante 6 horas, o meio com fármaco é substituído por meio de cultura sem fármaco e cultivadas durante 66 horas (5). No final da incubação são realizados esfregaços e dois microscopistas experientes contabilizam os parasitas viáveis.

Apesar de a análise microscópica ser um método barato, é um procedimento demorado, e subjetivo, que não permite a realização de estudos epidemiológicos em larga escala. Apesar das limitações que possui o ensaio RSA<sup>0-3h</sup> apresenta correspondência *in vitro* da suscetibilidade reduzida dos anéis jovens de *P. falciparum* à artemisinina até agora apenas documentada em estudos *in vivo*. A investigação *in vitro* destes fenótipos deve ser ampliada, para que se possa compreender a sua relação com a recrudescência e o tempo de depuração *in vivo* (5).

### 2.3 Detecção da viabilidade de *P. falciparum*

Um dos problemas que se coloca em relação ao ensaio RSA<sup>0-3h</sup>, é a dificuldade em avaliar a viabilidade dos parasitas (após exposição à DHA) através da sua morfologia por observação microscópica. Assim torna-se indispensável a otimização de um método simples, reprodutível e rigoroso para quantificar os parasitas viáveis.

A mitocôndria desempenha a nível celular um papel regulatório do metabolismo energético e oxidativo, refletindo assim a viabilidade. No nosso trabalho, optámos por focar-nos, na deteção da atividade mitocondrial como indicador de viabilidade dos parasitas expostos a fármacos. Os métodos a desenvolver pretendem:

- avaliar a viabilidade de *P. falciparum* durante o estado de dormência induzida pela ARTs, quantificando a atividade metabólica dos parasitas intraeritrocíticos, usando fluorescência;

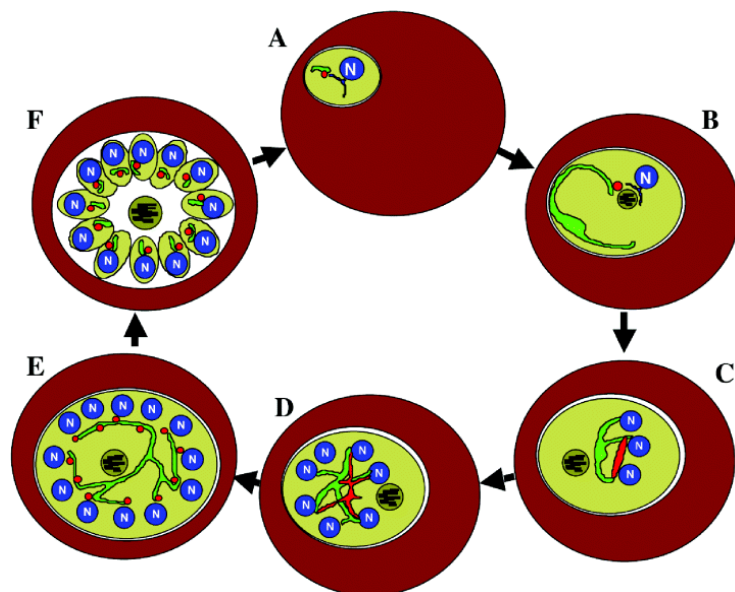
- construir curvas dose-resposta após incubação com antimaláricos;

Pretende-se portanto, otimizar um protocolo com vista a obter resultados relevantes de uma forma simples e rápida.

#### 2.3.1 A mitocôndria de *Plasmodium falciparum*

Os parasitas do género *Plasmodium* possuem uma única mitocôndria, que aumenta consideravelmente de tamanho ao longo do ciclo parasitário intraeritrocitário, até que se desenvolve uma rede mitocondrial tubular, que posteriormente se dividirá, de forma a que cada merozoíto resultante da esquizogonia receba uma mitocôndria funcional (Figura I-8) (99,100).

O metabolismo energético de *P. falciparum* difere do do mamífero hospedeiro, pois é mais simplificado e apresenta várias vias biossintéticas. A mitocôndria de *P. falciparum*, não oxida completamente a glucose necessária para a síntese de ATP mitocondrial e a cadeia de transporte de eletrões mitocondrial é de extrema importância para a biossíntese de pirimidina (99).



**Figura I-8 – Modelo da evolução mitocondrial durante o ciclo intraeritrocítico de *P. falciparum*.** A - Fase de anel, a mitocôndria é o organelo verde; B – trofozoíto, a mitocôndria começa a alongar-se através do citosol, frequentemente associa-se com a membrana plasmática. C, D e E - Durante a esquizogonia a mitocôndria ramifica-se. F - A divisão mitocondrial parece ocorrer logo antes da divisão celular, ficando cada merozoíto filho com uma pequena mitocôndria. N-núcleo. Adaptado de (6)

Foi detetada atividade transcricional de enzimas mitocondriais em parasitas dormentes, que posteriormente conseguiram recuperar, retomando o ciclo de desenvolvimento normalmente. Revelando que a mitocôndria está viável durante o estado de dormência e que a atividade mitocondrial é crítica para a sobrevivência e o crescimento dos parasitas dormentes (101).

A coloração da mitocôndria com fluoróforos vitais específicos, permite distinguir os parasitas dormentes-viáveis, das formas picnóticas inviáveis resultantes da exposição ao antimalárico.

### 2.3.2 Corantes vitais fluorescentes

Neste estudo, vamos investigar *in vitro* os efeitos da exposição de *P. falciparum* a 700 nM de DHA, sobre a morfologia, o desenvolvimento, crescimento e viabilidade de *P.*

*falciparum*. Estes parâmetros poderão ser analisados através da utilização de corantes fluorescentes.

O desenvolvimento e crescimento dos parasitas pode ser analisado com SYBR Green I, um agente intercalante, que quando ligado ao DNA de cadeia dupla é fluorescente. O complexo SYBR GREEN I – DNA absorve luz azul com comprimento de onda ( $\lambda$ ) máximo de 497 nm e emite luz verde com  $\lambda$  520 nm. Quanto maior a intensidade de fluorescência maior a quantidade de DNA (102,103).

A variação do potencial da membrana mitocondrial de *P. falciparum* pode ser avaliado usando JC-1 (5, 50, 6, 60-tetrachloro-1, 10, 3, 30 tetraethyl benzimidazolo carbocyanine iodide), um corante catiónico, que se encontra na forma de monómero no citoplasma e apresenta fluorescência verde (525 nm). Como o potencial de membrana de uma mitocôndria funcional possui uma carga negativa, permite que o corante lipofílico se acumule no seu interior e forme agregados, com fluorescência vermelha (590 nm) (104–106).

A integridade funcional da mitocôndria pode ser avaliada também através da utilização de Rodamina 123 (Rh123), um corante catiónico, fluorescente, carregado positivamente que é prontamente sequestrado pela mitocôndria ativa. Como este corante cora seletivamente a mitocôndria em células vivas, permite avaliar a atividade mitocondrial, quando a intensidade da fluorescência é quantificada por um fluorímetro. A Rh123 apresenta excitação a 507 nm e emissão a 529 nm (verde) (107–109) .

A resazurina é um corante frequentemente usado como indicador da viabilidade de células. No entanto, existem poucos relatos do uso deste composto em *P. falciparum* (110). A resazurina (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one10-oxide) é um corante azul que funciona como indicador de viabilidade celular quando é reduzida, através da atividade metabólica da célula, a resorufina (vermelha e fluorescente). A resorufina apresenta uma fluorescência cerca de 12 vezes superior à da resazurina (111). A quantidade de resorufina (fluorescente) pode ser quantificada (560 nm e 590 nm, respetivamente excitação e emissão) sendo proporcional ao número de células viáveis .

## **II- OBJETIVOS**



## II - OBJETIVOS

### 1. Objetivo Geral

O principal objetivo deste estudo consistiu em desenvolver um método rápido e robusto para o estudo da suscetibilidade à artemisina e derivados.

### 2. Objetivos Específicos

1.1. Otimização do ensaio RSA<sup>0-3h</sup> em microculturas de *P. falciparum*.

1.1.1. Quantificação da sobrevivência através da morfologia dos parasitas por microscopia ótica.

1.2. Otimização de um microteste *in vitro* baseado no RSA<sup>0-3h</sup> para quantificação de sobrevivência usando fluorescência.

1.2.1. Quantificação da sobrevivência usando intercalantes de DNA; atividade metabólica e potencial de membrana mitocondrial.

### **III- MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **1. Meios de cultura e soluções**

##### **1.1 Meio de cultura RPMI completo (RPMIc) para *P. falciparum***

Foi dissolvido meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (10, 44 g) em água MiliQ (1 L), com HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (5,94 g/L), Albumax (5g/L), hipoxantina (0,1 g/L) e bicarbonato de sódio 5% (w/v) (3,8 %) (v/v). A mistura foi agitada e filtrada em filtro com poro de 0.22 µm para esterilizar. A solução com pH 7,8 foi armazenada a 4 °C.

##### **1.2 Solução Phosphate Buffered Saline (PBS)**

Foi diluída uma pastilha de PBS em 200 mL de água destilada. Posteriormente a solução foi autoclavada e armazenada a 4 °C.

##### **1.3 Sorbitol a 5%**

Foram diluídos 50 g de D-Sorbitol em 1 L de água destilada. Depois de bem homogeneizada a solução foi filtrada com filtro de poro 0.22 µm e armazenada a 4 °C.

##### **1.4 Nycodenz**

Uma solução stock de Nycodenz foi preparada a partir de 55,2 g de Nycodenz sólido dissolvido em 200 mL de PBS. A solução foi homogeneizada durante 30 minutos. A seguir a solução foi filtrada em filtro com poro de 0.22 µm e armazenada a 4 °C.

##### **1.5 Giemsa a 20%**

A 40 mL de água tamponada foram adicionados 10 mL de Giemsa puro. A solução depois de bem homogeneizada foi filtrada com papel de filtro e armazenada a 4 °C.

##### **1.6 Dihidroartemisinina (DHA)**

A DHA foi pesada e solubilizada com DMSO (10%) e PBS. Prepararam-se soluções intermédias e a partir da diluição destas em RPMIc foram obtidas soluções de trabalho de 7000 nM.

##### **1.7 Corantes celulares**

Os corantes, Rh123, JC-1, SYBR Green I (SGI) e RZN foram diluídos em RPMIc ou PBS para fazer soluções stock que foram armazenadas a –20 °C. Imediatamente antes da utilização os corantes foram diluídos em meio de cultura RPMIc para se obter a concentração final desejada.

## **2. Cultura de *P. falciparum***

### **2.1 Eritrócitos não parasitados**

Foi colhido sangue, de doadores voluntários do IHMT, através de punção intravenosa em Vacutainer® com EDTA (*ethylenediamine tetraacetic acid*). De modo a obter apenas eritrócitos (RBCs), o sangue colhido foi centrifugado durante 3 minutos a 2500 rpm e aspirado o plasma. Para se retirarem os leucócitos, o *pellet* foi lavado por centrifugação com PBS. Este processo foi repetido três vezes. No final, ao *pellet* de RBCs obtido, foi adicionado igual volume de RPMIc de modo a obter um hematócrito (HTC) de 50%. Os eritrócitos foram armazenadas a 4° C até à sua utilização.

### **2.2 Descongelamento de *P. falciparum***

Para a descongelamento de *P. falciparum* foram necessárias duas soluções estéreis: Solução A – 12% (w/v) de NaCl; solução B – 1,6% (w/v) de NaCl. Ampolas congeladas de três estirpes de *P. falciparum* 3D7 (clone sensível à CQ), Dd2 (clone resistente à CQ) e 1240 (clone resistente à ARTs) foram retiradas do azoto líquido e descongeladas. A solução A foi adicionada lentamente a cada uma das ampolas (0,2 mL por cada mL de *pellet*) e bem homogeneizada durante 3 minutos. A seguir adicionou-se a solução B da mesma forma (10 mL para 1 mL de *pellet*) e centrifugou-se a mistura durante 3 minutos a 2500 rpm. Foi aspirado o sobrenadante e transferido o *pellet* para um frasco de cultura com um HTC final de 5% (300 µL RBCs/ 3 mL RPMIc). Ambas as estirpes foram mantidas em culturas (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) de acordo com o método descrito em (Trager and Jensen, 1976) (112).

### **2.3 Monitorização das culturas de *P. falciparum***

Diariamente foi calculada a parasitemia das culturas para avaliar o seu desenvolvimento. A parasitemia foi calculada a partir da observação microscópica (ampliação 1000x) de esfregaços, fixados com metanol a 100%, e corados com Giemsa 20% durante 30 minutos.

#### 2.4 Sincronização de cultura, *in vitro*, de *P. falciparum*

Para preparar as culturas para os ensaios de susceptibilidade e RSA<sup>0-3h</sup>, as culturas foram sincronizadas com sorbitol 5%, de modo a obter um predomínio de formas jovens (anéis) (Lambros & Vanderberg 1979) (113).

As culturas foram centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi retirado e adicionado sorbitol 5% (9 mL) (aproximadamente 1 mL de *pellet*). Após agitação vigorosa, a cultura foi incubada durante 5 minutos a 37°C, novamente agitada vigorosamente e incubada a 37°C por mais 5 minutos. Posteriormente foi centrifugada durante 5 minutos a 2500 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspensionado em PBS. Depois de duas lavagens por centrifugação, o HTC foi ajustado para 5% com hemácias e meio de cultura RPMIc.

#### 2.5 Concentração de formas maduras de *P. falciparum* pelo método Nycodenz®

Para a concentração de formas maduras de *P. falciparum* foi utilizado o gradiente de densidade Nycodenz® a 100% em PBS (114). A solução de Nycodenz® foi preparada como descrito na secção III-1.4. A cultura, com um rácio anéis: (trofozoítos + esquizontes) maior que 2:1, foi centrifugada durante 3 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi aspirado e o *pellet* foi lavado, três vezes, por centrifugação (2500 rpm durante 3 minutos) em 5 mL de PBS. Após a lavagem o *pellet* foi ressuspensionado em PBS na proporção 1/9 (cultura/PBS) obtendo-se assim uma solução a 10%. Esta suspensão foi delicadamente adicionada, com uma pipeta, a uma base de Nycodenz, respeitando a proporção 2/1 (Nycodenz/ suspensão 10%) e centrifugada a 1100 g, 20 °C, travão e aceleração 5, durante 20 minutos.

A 1ª camada foi desprezada e recolhido o anel de esquizontes, que foi lavado três vezes com PBS. Foi preparado um esfregaço fino, corado com Giemsa, para avaliar a parasitémia de esquizontes. O *pellet* foi devolvido a condições de cultura com HCT final de 2% (200 µL RBCs/ 10 mL RPMIc) e incubado a 37 °C, 5%CO<sub>2</sub>, até completar o ciclo de reinvasão.

#### 3. Otimização de teste de suscetibilidade *in vitro* baseado no ensaio RSA<sup>0-3h</sup>

Trabalhos recentes demonstraram haver uma correlação entre o tempo de depuração parasitária *in vivo* e a susceptibilidade dos parasitas *in vitro*, quando se submetem anéis jovens (0-3 horas pós-invasão) de *P. falciparum* a pulsos de 6 horas com 700 nM de DHA e se analisa a percentagem de sobrevivência após 66 horas de incubação (5) .

No nosso trabalho, partindo do ensaio RSA<sup>0-3h</sup> *in vitro*, descrito anteriormente (4) e que se encontra no anexo I, pretendemos otimizar uma metodologia, para a realização de ensaios de pulso de fármacos em microculturas e com recurso a fluoróforos, que permitam a obtenção de resultados fiáveis, reprodutíveis e facilmente exequíveis.

##### 3.1 Sincronização das culturas

Para a realização do ensaio de susceptibilidade com pulso de fármaco é necessário ter culturas altamente sincrónicas para se obterem parasitas com a idade desejada (0-3h pós invasão).

Uma cultura de 10 mL com parasitemia  $\geq$  a 10% foi sincronizada duas vezes, com intervalo de 48 horas, com sorbitol (secção III-2.4). Esquizontes maduros sincronizados foram concentrados através de um gradiente de densidades com Nycodenz (secção III-2.5). Após 24 horas foi feita uma nova concentração das formas maduras, que foram incubadas durante 3 horas , após as quais se seguiu uma nova sincronização com sorbitol, para eliminar os esquizontes ainda existentes. Foi preparada uma cultura com HTC 2% e parasitemia 0,5% -1% com os anéis entre 0-3 horas.

##### 3.2 RSA<sup>0-3h</sup> adaptado

Com o objetivo de simplificar e permitir a análise dos dados através da fluorescência lida por um fluorímetro, foram avaliadas diferentes condições separadamente. Sempre que uma condição foi considerada ótima, passou-se à avaliação de uma nova condição.

###### a) Seleção do tipo de placa

Para a realização do ensaio, optou-se por adaptar o protocolo RSA<sup>0-3h</sup> em anexo, utilizando placas de 96 poços. Foram avaliadas placas de 96 poços com fundo plano,

### III – MATERIAIS E MÉTODOS

placas com fundo em V e placas negras. Para selecionar a placa ideal para o ensaio foram tidos em conta os seguintes critérios:

- i. desenvolvimento e multiplicação dos parasitas;
- ii. quantidade de cultura sincronizada necessária;
- iii. eficiência durante a lavagem do fármaco;
- iv. necessidade de trocar o meio de cultura durante as 72 horas de incubação;
- v. existência de células suficientes para executar esfregaços.

Para testar os três tipos de placas, a partir de uma mesma cultura, com HTC 2% e parasitemia inferior a 1%, foram distribuídos por cada uma delas, 100 µL (seis poços) e 200 µL (seis poços) de cultura, que se mantiveram incubadas (37 °C e atmosfera 5% CO<sub>2</sub>) durante 72 horas, após as quais se fizeram esfregaços fixados com metanol e corados com Giemsa para avaliar o desenvolvimento e crescimento dos parasitas de cada cultura.

#### **b) Lavagem da cultura para retirar o fármaco**

Partindo de uma cultura inicial com HTC 2% e parasitemia inferior a 1%, foram distribuídos 100 µL da cultura por poço, num total de 12, e incubados com DHA por 6 horas. Em seis dos poços foram feitas três lavagens com 100 µL de PBS e nos restantes seis foi feita apenas uma lavagem com RPMIc. Após retirado o fármaco por centrifugação, o *pellet* de cada cultura foi ressuscitado em 100 µL de RPMIc e incubado durante 66 horas. Após o período de incubação foram feitos esfregaços corados com Giemsa para avaliar o desenvolvimento das culturas.

#### **4. Avaliar a viabilidade de *P. falciparum* após exposição a DHA**

A viabilidade de parasitas *P. falciparum*, na presença de um antimalárico, foi avaliada com recurso a diversos métodos, tendo em conta o DNA, a atividade mitocondrial e a atividade metabólica, que foram examinados com recurso a intercalantes de DNA e corantes vitais fluorescentes. A viabilidade foi analisada por microscopia óptica, microscopia de fluorescência e quantificação da intensidade de fluorescência emitida em fluorímetro de microplacas.

#### 4.1 Microscopia Ótica

A viabilidade dos parasitas foi avaliada por exame microscópico de esfregaços finos, fixados com metanol e corados com Giemsa. Foi feita a contagem dos parasitas que se desenvolveram em anéis de segunda geração ou trofozoítos com morfologia normal. Para obter um esfregaço homogêneo em todas as lâminas, as culturas foram ressuspensas, transferidas para um tubo *Eppendorf* e centrifugadas a 2000 rpm durante 30 segundos. Foram retirados 2  $\mu$ L do *pellet* e feitos os esfregaços. As parasitêmias foram calculadas a partir de um total de, pelo menos, 10.000 eritrócitos por ensaio. As lâminas de cada ensaio foram lidas por dois microscopistas diferentes e no caso de surgirem discrepâncias nas contagens superiores a 20%, as lâminas foram reanalisadas por um terceiro microscopista.

#### 4.2 Relação entre a viabilidade e a fluorescência de SYBR Green I

Após as 72 horas de incubação foram adicionados a cada um dos poços 100  $\mu$ L de SYBR Green I a 0,25  $\mu$ L /mL. Depois de incubar a placa, no escuro e a 37 °C, por uma hora, a cultura foi lavada por centrifugação, ressuspensa em 100  $\mu$ L de PBS e a fluorescência foi medida a 485 nm (excitação) e 528 nm (emissão) num fluorímetro de microplacas. A intensidade da fluorescência foi analisada e comparada com percentagem de sobrevivência dos parasitas, calculada a partir de lâminas coradas com Giemsa.

#### 4.3 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) com JC-1

As variações no  $\Delta\Psi_m$  foram analisadas corando as culturas de *P. falciparum* tratadas com 700 nM de DHA durante 6 horas e as não tratadas, com 5  $\mu$ M de JC-1. As microculturas foram incubadas durante 30 minutos a 37°C, após os quais se adicionou DAPI. Imediatamente após a incubação foram preparadas lâminas com as culturas que foram prontamente observadas, em microscópio de fluorescência, para prevenir a morte dos parasitas e evitar o desvanecimento da coloração ao longo do tempo e/ ou durante a exposição prolongada a fontes de luz fluorescente.



### III – MATERIAIS E MÉTODOS

Foi avaliado o  $\Delta\Psi_m$  pela medição da intensidade de fluorescência verde dos monómeros JC-1 e vermelha dos agregados JC-1 que se encontram no interior da mitocôndria. A leitura da intensidade de fluorescência foi feita num fluorímetro de microplacas, fluorescência verde (525 nm) e fluorescência vermelha (590 nm). Os valores obtidos permitiram calcular a proporção de JC-1 (vermelho) / JC-1 (verde) para avaliar a perda de potencial da membrana mitocondrial. Os valores obtidos foram comparados com a percentagem de sobrevivência obtida através da contagem de lâminas coradas com Giemsa.

#### 4.4 Determinação da viabilidade mitocondrial com Rodamina 123 (Rh123)

As microculturas preparadas de acordo com o item III-3.2, foram coradas com 5  $\mu$ M de Rh123 e incubadas no escuro, a 37°C durante 30 minutos, tendo sido posteriormente adicionado DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para corar o núcleo. Após a incubação foi feita uma lâmina a fresco que foi observada no microscópio de fluorescência para detetar os parasitas e avaliar a sua viabilidade através da distribuição mitocondrial da Rh123. As preparações foram imediatamente observadas após a incubação para prevenir a morte dos parasitas e evitar o desvanecimento da coloração ao longo do tempo e / ou durante a exposição prolongada a fontes de luz fluorescente.

Simultaneamente, foi avaliada a integridade da função mitocondrial pela quantificação da intensidade de fluorescência da Rh123, que é dependente do  $\Delta\Psi_m$ , usando um fluorímetro de microplacas, com excitação a 507 nm e emissão a 529 nm. Os valores obtidos foram comparados com a percentagem de sobrevivência obtida através da contagem de lâminas coradas com Giemsa.

#### 4.5 Análise estatística

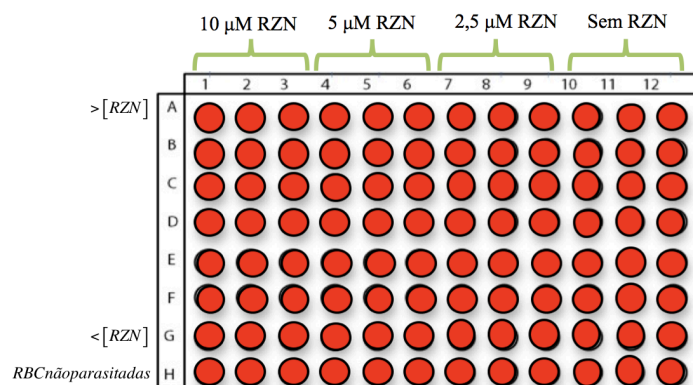
Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism version 6.0 (Trial) 2015 (GraphPad Inc. All rights reserved). Para comparar duas amostras, independentes e não relacionadas, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Este teste permitiu comparar a significância estatística entre as percentagens de sobrevivência das amostras expostas a 700 nM de DHA com a das amostras não expostas. No caso de  $p < 0,05$  foi aceite uma diferença estatisticamente significativa

entre as duas amostras. Todos os ensaios foram realizadas em sextuplicado, e repetidos no mínimo três vezes .

#### 5. Relação entre a viabilidade de *P. falciparum* e resazurina

##### 5.1 Determinação da concentração e do tempo de incubação para fluorescência ótima da resazurina para distinção de parasitêmias

Numa placa de 96 poços transparente, distribuíram-se 100  $\mu\text{L}$ /poço de RBCs sãs com  $\text{HTC}=4\%$ . Na primeira linha da placa foram adicionados 100  $\mu\text{L}$ /poço de uma cultura da estirpe 3D7 de *P. falciparum* com  $\text{HTC}=4\%$ , a partir do qual se iniciou uma diluição seriada de 1:2. Como controlo foram utilizadas apenas RBCs sãs. Adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de RZN (20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ ) de acordo com o esquema da Figura III.1. Depois de bem homogeneizada a placa foi incubada a  $37^\circ\text{C}$ . Após 1 hora a intensidade de fluorescência foi quantificada num fluorímetro (560 nm de excitação e 590 nm de emissão). Foram feitas novas leituras de hora a hora até completar 6 horas de incubação com RZN.



**Figura III-1 – Representação esquemática do ensaio para a determinação da concentração e do tempo de incubação para fluorescência ótima da resazurina.**

##### 5.2 Relação entre parasitêmia e fluorescência da resazurina

Numa placa de 96 poços transparente, distribuíram-se 100  $\mu\text{L}$ /poço de RBCs sãs com  $\text{HTC}=4\%$ . Na primeira linha da placa foram adicionados 100  $\mu\text{L}$ /poço de uma cultura da estirpe 3D7 de *P. falciparum* com  $\text{HTC}=4\%$ , a partir do qual se iniciou uma diluição seriada de 1:2. Como controlo foram utilizadas apenas RBCs sãs. Adicionaram-se 100

$\mu\text{L}$  de RZN a 20  $\mu\text{M}$  em cada poço. Depois de bem homogeneizada a placa foi incubada a 37°C durante 4 horas, altura em que a intensidade de fluorescência foi quantificada num fluorímetro (560 nm de excitação e 590 nm de emissão). Foram feitas novas leituras de hora a hora até completar 6 horas de incubação com RZN.

#### 5.3 Análise estatística

Para todos os ensaios realizados foi analisada a sua qualidade. Para tal, no *software Microsoft Excel*, foram calculados: média ( $\mu$ ); desvio padrão ( $\sigma$ ); signal to background ratio (S/B), signal to noise ratio (S/N)) e o factor de desempenho  $Z'$ , que foram calculados de acordo com as fórmulas:

$$Z' = 1 - [(3\sigma_{(+)} + 3\sigma_{(-)}) / \mu_{(+)} - \mu_{(-)}]$$

$$S/N = [(\mu_{(+)} - \mu_{(-)}) / \sigma_{(-)}]$$

$$S/B = \mu_{(+)} / \mu_{(-)};$$

onde  $\mu_{(+)}$  e  $\sigma_{(+)}$  são a media e o desvio padrão dos eritrócitos parasitados, respetivamente;  $\mu_{(-)}$  e  $\sigma_{(-)}$  são a media e o desvio padrão dos eritrócitos não parasitados, respetivamente.

A qualidade e desempenho de um ensaio pode ser avaliada de diversos modos. Podem ter-se em conta medidas relacionadas com o equipamento e a sensibilidade do ensaio, como S/N e S/B. A relação S/N indica a faixa dinâmica (dynamic range) que é possível abranger com o equipamento, isto é, a gama de intensidades que podem ser detetadas desde o menor sinal até ao máximo sinal. Quanto maior for este rácio menos é o efeito do ruído sobre a deteção ou medição do sinal. O valor de S/N não tem em conta toda a informação necessária para avaliar a qualidade do ensaio. O rácio S/B não tem em conta a variação dos dados, apenas considera as médias do sinal positivo e do background. A medida estatística  $Z'$  tem em conta a variação dos dados do ensaio (tanto das amostras como dos controlos) e a faixa dinâmica do sinal. Quanto maior for o valor de  $Z'$  mais discriminatório é o ensaio, assim:  $Z'=1$  – ensaio ideal;  $Z'\geq 0,5$  – ensaio bom a excelente;  $0,5>Z'>0$  – ensaio pouco satisfatório;  $Z' \leq 0$  – ensaio não satisfatório (115).

#### 5.4 Determinação do IC<sub>50</sub> da resazurina

Uma cultura sincronizada, da estirpe 3D7 de *P. falciparum*, foi centrifugada durante 3 minutos a 2500 rpm e desprezado o sobrenadante. A parasitemia foi ajustada para 1% e o hematócrito para 3%. No primeiro poço, de uma placa de 96 poços, foram adicionados 135 µL da cultura e nos restantes onze 100 µL. Posteriormente foram adicionados 15 µL de RZN ao primeiro poço (concentração final de RZN 1250 µM), a partir do qual se iniciou uma diluição seriada de 1:3. Como controlo foi utilizada cultura sem adição de RZN. A placa foi incubada a 37°C, 5%CO<sub>2</sub> durante 48 horas. No final da incubação foram adicionados 100 µL de SYBR Green I (0,25 uL/mL) a cada poço. A placa foi sujeita às mesmas condições de incubação por 1 hora, centrifugada a 4000 rpm durante 2 minutos. Depois foi rejeitado o sobrenadante e adicionados 100 µL de PBS que foram bem homogeneizados com o *pellet*. A intensidade de fluorescência foi quantificada num leitor de microplacas (497 nm excitação e 520 nm emissão).

A percentagem de sobrevivência dos parasitas foi calculada a partir dos valores de fluorescência (RFUs- relative fluorescence units) obtidos em cada um dos poços correspondentes a cada concentração de RZN, relativamente ao poço controlo (sem composto). A partir da curva de dose-resposta e usando uma regressão não-linear, recorrendo ao *software GraphPad Prism version 6.0 (Trial) 2015 (GraphPad Inc. All rights reserved)* foi calculado o valor de IC<sub>50</sub> para a RZN.

#### 5.5 Determinação do IC<sub>50</sub> da cloroquina para as estirpes 3D7 e Dd2 de *P. falciparum* com resazurina

Culturas sincronizadas, das estirpe 3D7 e Dd2 de *P. falciparum*, foram centrifugadas durante 3 minutos a 2500 rpm e desprezado o sobrenadante. A parasitemia foi ajustada para 1% e o hematócrito para 3%. No primeiro poço, de uma placa de 96 poços, foram adicionados 135 µL da cultura e nos restantes onze 100 µL. Posteriormente foram adicionados 15 µL de CQ ao primeiro poço (concentração final, 1000 nM – 3D7 e 10000 nM – Dd2), a partir do qual se iniciou uma diluição seriada de 1:3. Como controlo foi utilizada cultura sem adição de CQ. A placa foi incubada a 37°C, 5%CO<sub>2</sub> durante 48 horas. No final da incubação foram adicionados 100 µL de RZN (20 µM) a cada poço. As placas foram sujeita às mesmas condições de incubação por 6 horas. A

intensidade de fluorescência foi quantificada num leitor de microplacas ( 560 nm excitação e 590 nm emissão).

A percentagem de sobrevivência dos parasitas foi calculada a partir dos valores de fluorescência obtidos em cada um dos poços correspondentes a cada concentração de CQ, relativamente ao poço controlo (sem CQ).

A partir da curva de dose-resposta e usando uma regressão não-linear, recorrendo ao *software GraphPad Prism version 6.0 (Trial) 2015 (GraphPad Inc. All rights reserved)* foi calculado o valor de IC<sub>50</sub> para a CQ.

#### **5.6 Aplicação da resazurina para determinação da sobrevivência de *P. falciparum***

##### ***5.6.1 Determinação da percentagem de sobrevivência das estirpes 3D7 e 1240 de *P. falciparum* com resazurina***

Numa placa transparente de fundo plano de 96 poços, foram distribuídos, por poço, 90µL de cultura assíncrona (HTC=2% e parasitemia 0,5-1%), num total de 12 poços. Seis deles foram expostos a 700 nM de DHA e os restantes seis serviram de controlo, tendo sido adicionados apenas 10 µL de RPMIc. Foram também colocadas na placa RBC (HTC=2%) tratadas (700 nM de DHA) e não tratadas. A placa foi incubada durante 6 horas a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Para remover a DHA, a placa foi centrifugada a 4000 rpm durante 2 minutos, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e o *pellet* foi ressuspendido em 100 µL de RPMIc, que após centrifugação foi aspirado. Foram adicionados 100 µL de RPMIc a cada um dos poços, e o seu conteúdo transferido para novos poços. Posto isto a placa foi incubada durante 66 horas, a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Após o período de incubação foram adicionados 100 µL de RZN (20 µM) e a placa foi incubada durante 6 horas a 37 °C e a intensidade de fluorescência foi quantificada num fluorímetro (560 nm de excitação e 590 nm de emissão). A placa foi centrifugada a 4000 rpm durante 2 minutos, 100 µL do sobrenadante, de cada poço, foram cuidadosamente retirados e transferidos para uma placa de 96 poços preta. A intensidade de fluorescência foi quantificada num fluorímetro (560 nm de excitação e 590 nm de emissão). Os resultados foram expressos como a percentagem de sobrevivência calculada através da fórmula: (110,115).

#### ***5.6.2 Análise estatística***

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism version 6.0 (Trial) 2015 (GraphPad Inc. All rights reserved). Para comparar duas amostras, independentes e não relacionadas, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. No caso de  $p < 0,05$  foi aceite uma diferença estatisticamente significativa entre as duas amostras. Todos os ensaios foram realizadas em sextuplicado, e repetidos no mínimo três vezes . Foram utilizadas as correlações de Pearson e de Spearman para determinar a correlação entre os valores obtidos entre os ensaios.

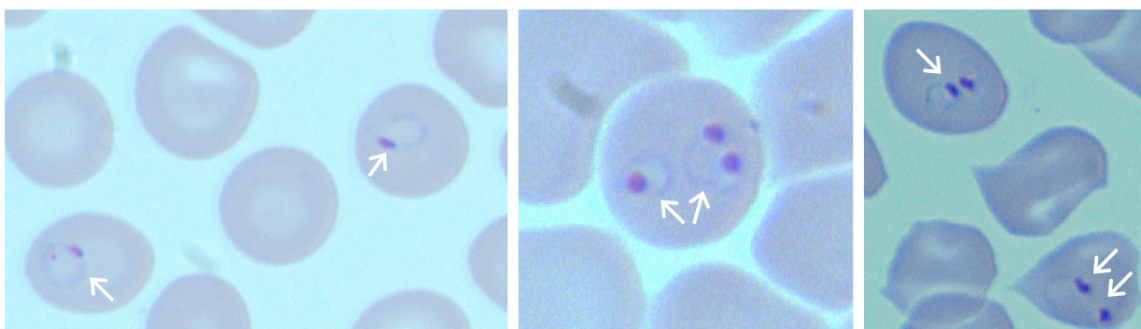
## **IV-    RESULTADOS**

### 1. Otimização do teste de susceptibilidade *in vitro* baseado no ensaio RSA<sup>0-3h</sup>

Ao longo do nosso trabalho foram investigados vários métodos de avaliar a sobrevivência de *P. falciparum* em cultura na presença de um inibidor nomeadamente compostos com atividade antimalárica.

#### 1.1 Sincronização das culturas

Da conjugação de sincronizações com sorbitol e da concentração de esquizontes maduros (secção III-3.1) foi possível obter culturas síncronas com anéis entre as 0 e 3 horas de idade.

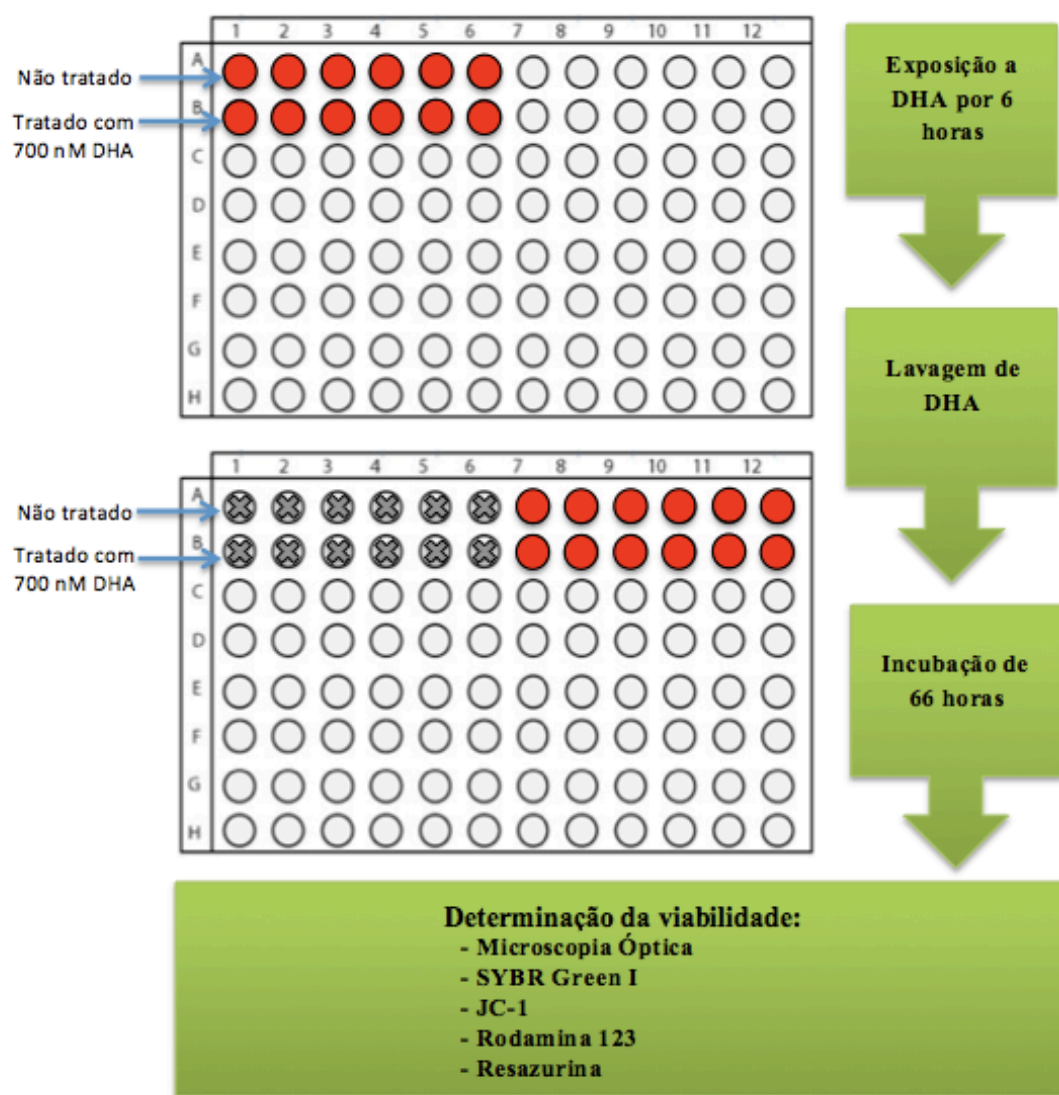


**Figura IV-1 - Cultura de *P. falciparum* após o processo de sincronização.** Os esfregaços foram corados com Giemsa (Ampliação 1000 x). As setas indicam anéis com idade < 3 horas.

#### 1.2 RSA<sup>0-3h</sup> adaptado

Numa placa transparente de fundo plano de 96 poços, foi distribuída a cultura de *P. falciparum* (HTC=2% e parasitemia 0,5-1%). Seis réplicas foram tratadas com 700 nM de DHA e as restantes seis serviram de controlo (sem fármaco), tendo sido adicionado apenas RPMIc. A placa foi incubada durante 6 horas nas condições *standard* de cultura (secção III-2.2), centrifugada, o sobrenadante descartado e o *pellet* foi ressuspendido em meio RPMIc, incubado 66 horas nas condições *standard* de cultura.





**Figura IV-2 – Representação esquemática do ensaio de suscetibilidade RSA<sup>0-3h</sup> adaptado otimizado.**

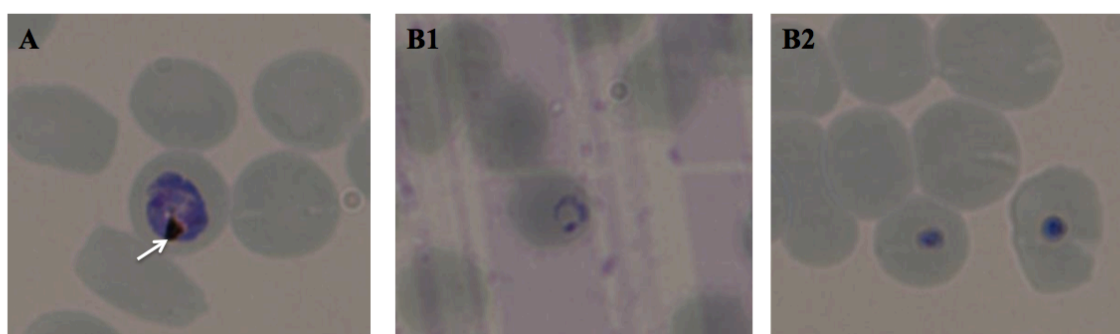
## **2. Avaliação da sobrevivência de *P. falciparum* após exposição a DHA**

Para avaliar a sobrevivência dos parasitas tratados com 700 nM de DHA durante 6 horas, foram realizados diferentes ensaios capazes de detetar, alterações morfológicas (microscopia ótica), desenvolvimento-divisão nuclear (SYBR GREEN I), potencial de membrana mitocondrial (JC-1, Rh123) e atividade metabólica (RZN).

### 2.1 Avaliação da morfologia dos parasitas por Microscopia Ótica

O grau de desenvolvimento e parasitemia dos parasitas tratados com DHA e no controle sem fármaco, foi avaliado em esfregaços, corados com Giemsa e observados por microscopia ótica (MO).

A parasitemia de cada cultura foi calculada a partir de esfregaços sanguíneos e tendo em conta os parasitas viáveis. A figura IV-3 mostra esfregaços corados com Giemsa onde se podem observar parasitas viáveis (figura IV-3A) onde se distingue presença de hemozoína e desenvolvimento parasitário refletido pelo número de núcleos. Quando submetidos a DHA os parasitas apresentam atraso no desenvolvimento, sendo observáveis formas de anel ou perda de viabilidade traduzida pela presença de formas picnóticas.



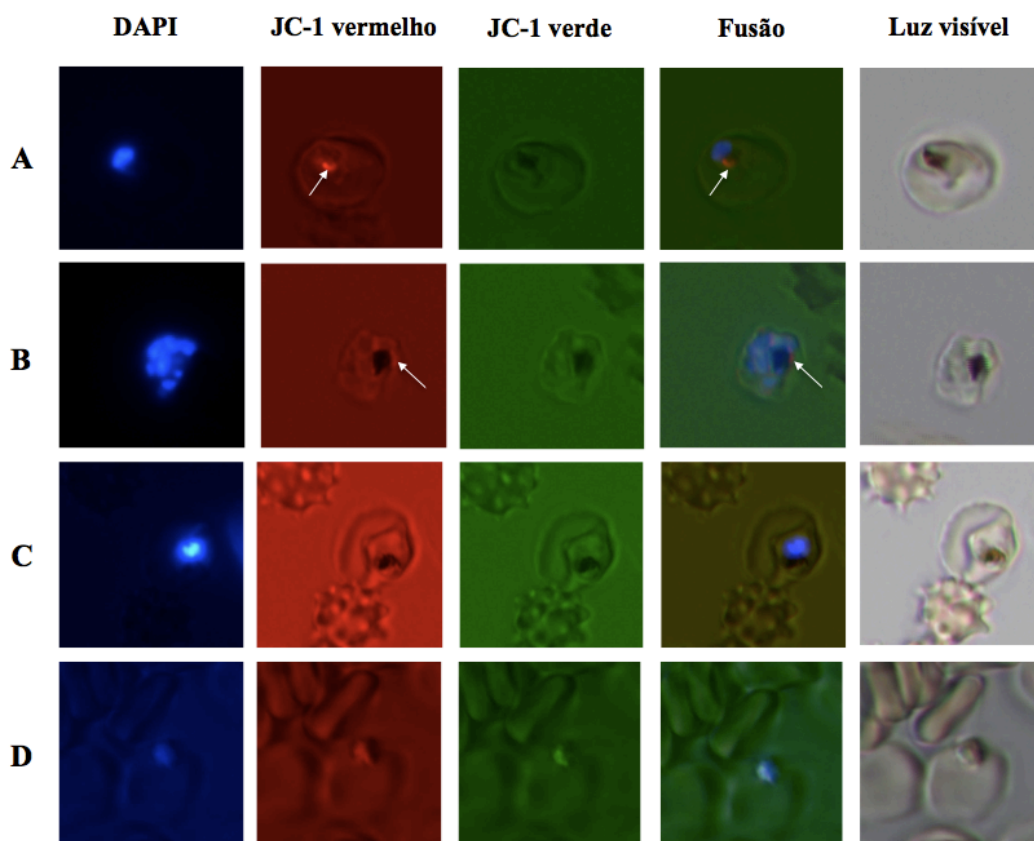
**Figura IV-3 – Morfologia dos parasitas após 72 horas de incubação com e sem DHA.** Ampliação 1000 x. **A** - controlo sem DHA, a seta indica a hemozoína; **B** - 6 horas de exposição a 700 nM de DHA, **B1** - anel; **B2** - formas picnóticas inviáveis.

### 2.2 Variação do potencial de membrana mitocondrial com JC-1

Para detetar o potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) as culturas não expostas e expostas a DHA foram coradas com JC-1 (secção III-4.3) e observadas em microscópio ótico de fluorescência (MF). Os parasitas viáveis (com mitocôndria polarizada) apresentaram fluorescência vermelha localizada, ausente nos parasitas inviáveis indicativo de despolarização da membrana mitocondrial (figura IV-4).

Na Figura IV-4 são observáveis a azul os núcleos (cromatina) corados com DAPI, o eritrócito parasitado (luz visível) e em A e B observa-se fluorescência vermelha localizada resultante da acumulação de agregados de JC-1 devido à existência de

potencial de membrana, o que indica que a mitocôndria está funcional. Em D e C a ausência de acumulação de fluorescência vermelha indica que ocorreu perda de potencial de membrana e que a mitocôndria está inativa.



**Figura IV-4 – Eritrócitos parasitados com *P. falciparum* e corados com JC-1.** Culturas tratadas com 700 nM de DHA durante 6 horas (C e D) e culturas não tratadas (A e B), foram incubadas com 5  $\mu$ M de JC-1 durante 30 minutos a 37°C. Após a adição de DAPI foram preparadas lâminas que foram observadas a fresco em microscópio ótico de fluorescência. A - trofozoíto, B - esquizonte, C - trofozoíto, D - forma picnótica. As setas indicam mitocôndrias ativas, com fluorescência vermelha. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole); JC-1 vermelho, ~590 nm; JC-1verde, ~525 nm; LV, luz visível.

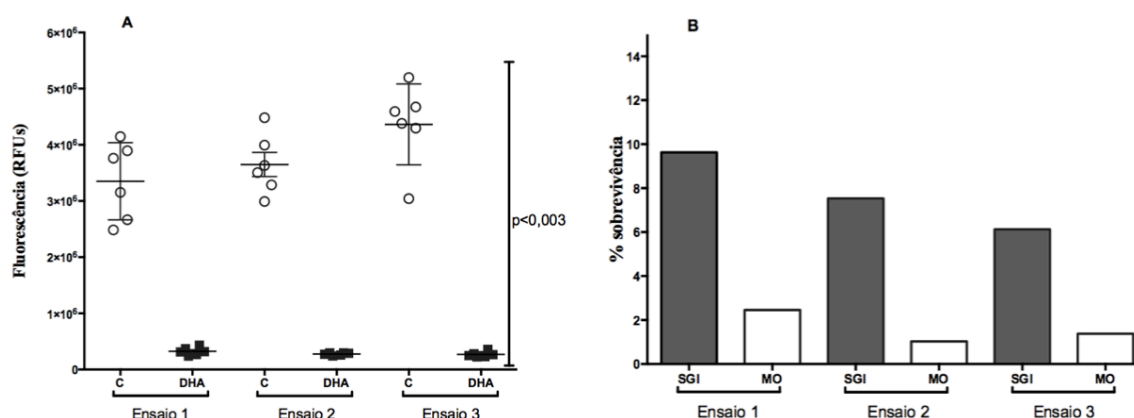
Foi efetuada a tentativa de quantificar a sobrevivência dos parasitas quando expostos a DHA, expressa pela  $\Delta\Psi_m$  determinado o rácio JC-1 vermelho/ JC-1 verde da fluorescência emitida a ~525 nm (verde) e ~590 nm (vermelho). Analisando os três ensaios é possível constatar que não existe uma diferença estatisticamente significativa

(teste Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ) entre a viabilidade/sobrevivência estimada por JC-1 para as culturas não expostas e expostas a 700 nM de DHA. Pelo que foi decidido tentar outro método (Anexo II).

### 2.3 Avaliação do desenvolvimento-divisão nuclear dos parasitas usando SYBR Green I

O processo de otimização do método de avaliação da suscetibilidade de *P. falciparum* a antimaláricos, baseado na detecção da fluorescência do intercalante de DNA – SYBR Green I, foi efetuado anteriormente (Machado et al, 2015) (116).

O desenvolvimento-divisão nuclear dos parasitas tratados com DHA e no controlo sem fármaco, foi avaliado pela quantificação da fluorescência emitida pelo intercalante de DNA SYBR Green I, que é proporcional à quantidade de DNA em cadeia dupla presente.



**Figura IV-5 – Quantificação de parasitas após 72 horas de incubação com e sem DHA por intensidade de fluorescência de SYBR Green I e microscopia ótica.** **A** - intensidade de fluorescência de SGI em parasitas tratados com DHA 700nM (quadrados) e no controlo sem fármaco (bolas abertas). Representados os três ensaios cada um com 6 réplicas. **B** - Percentagem de sobrevivência calculada por microscopia ótica (MO) ( $P\% \text{ DHA} / P\% \text{ C} \times 100$ ), barra branca e por fluorescência de SGI ( $\text{RFUs}_{\text{DHA}} / \text{RFUs}_{\text{C}} \times 100$ ), barra cinzenta.

## IV - RESULTADOS

A quantificação do grau de desenvolvimento-divisão dos parasitas foi efetuada comparando a intensidade da fluorescência emitida pelos núcleos/DNA nas culturas tratadas relativamente às culturas não tratadas (Figura IV-5A). Em paralelo (no mesmo ensaio) o grau de desenvolvimento, morfologia e parasitemia, foram também avaliados em esfregaços, corados com Giemsa e observados por microscopia ótica (Figura IV-5B).

Como podemos observar na figura IV-5A, os parasitas tratados com DHA apresentam uma intensidade de fluorescência significativamente menor ( $p < 0,003$ ; Mann-Whitney - Anexo III) que os parasitas não tratados (controle).

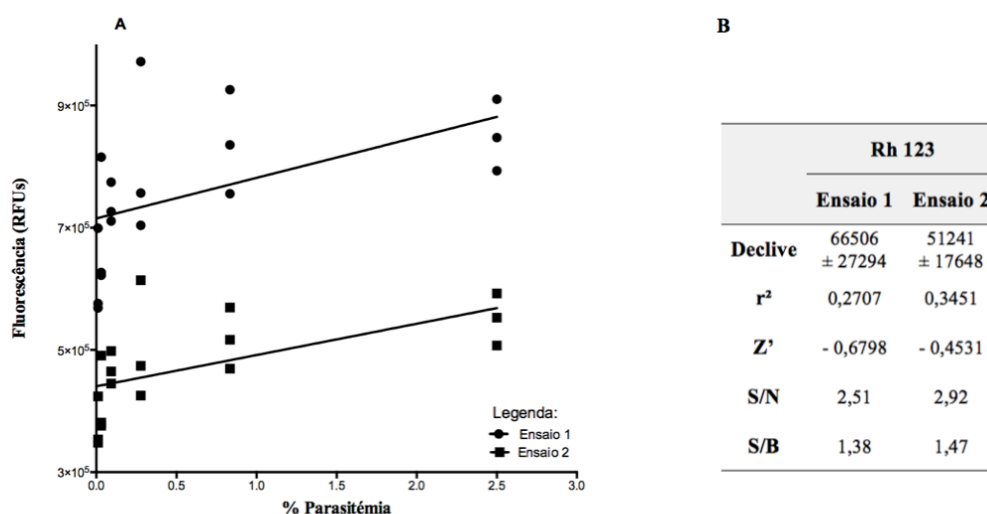
A viabilidade dos parasitas estimada usando SGI é em média 5,22 ( $\pm 1,81$ ) vezes superior à estimada por MO (figura IV-6B) (Anexo III).

### **3. Avaliação da viabilidade dos parasitas através do potencial de membrana mitocondrial**

#### **3.1 Determinação da viabilidade com rodamina 123**

##### ***3.1.1 Avaliação da linearidade do sinal de fluorescência e o valor $Z'$ do ensaio***

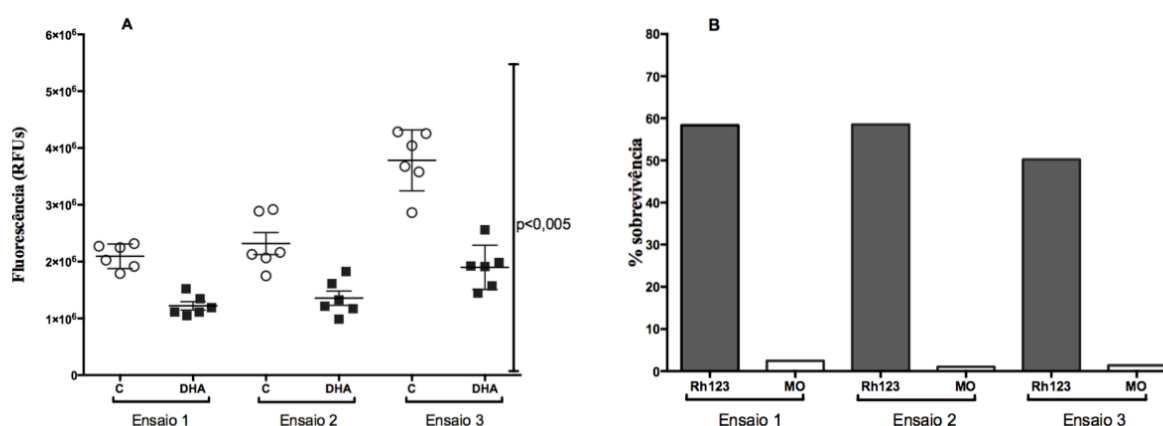
Foi analisada a relação entre a parasitemia e a intensidade da fluorescência da Rh123, através de uma regressão linear a partir da qual foram determinados os valores do declive e de  $r^2$ , para estabelecer o perfil de linearidade. Foram realizados dois ensaios distintos e verificou-se que não existe uma relação linear entre a parasitemia e a intensidade da fluorescência da Rh123, com  $r^2 = 0,2707$  e  $r^2 = 0,3451$  (Figura IV-6B). Os valores  $r^2 < 0,5$  e  $Z' < 0$  descritos na figura IV-6B, permitem aferir que o método não apresenta qualidade, robustez e sensibilidade para ser validado.



**Figura IV-6 - Otimização das condições de ensaio com Rh123.** **A** - Reta de regressão linear e correspondente  $r^2$  da intensidade de fluorescência, para parasitas da estirpe 3D7 de *P. falciparum* em estágio de anel, para diferentes parasitêmias. **B** - Indicadores da performance da incubação com Rh123 em dois ensaios distintos (n=3).  $r^2$  – coeficiente de determinação;  $Z'$  - factor de desempenho; S/B – signal to background ratio; S/N - signal to noise ratio.

Para avaliar a viabilidade de *P. falciparum*, as culturas tratadas e não tratadas com DHA (6h), foram coradas com Rh123 (secção III-4.4). Após o período de incubação, foi quantificada e comparada a intensidade da fluorescência emitida pela Rh123 nas culturas tratadas relativamente às culturas não tratadas (Figura IV-7A), sendo significativamente mais elevada nas culturas não tratadas ( $p < 0,003$ ; Mann-Whitney - Anexo IV). A sobrevivência dos parasitas traduzida pela percentagem de fluorescência das culturas tratadas relativamente às não tratadas foi em média de 57.7% (Tabela IV-1). No entanto, quando comparadas com a sobrevivência calculada a partir da MO, verificou-se que a viabilidade dos parasitas estimada usando Rh123 é ~39 vezes superior à estimada por MO (Anexo IV).

## IV - RESULTADOS



**Figura IV-7 – Quantificação de parasitas após 72 horas de incubação com e sem DHA por intensidade de fluorescência de Rh123 e microscopia ótica. A - intensidade de fluorescência de Rh123 em parasitas tratados com DHA 700nM (quadrados) e no controlo sem fármaco (bolas abertas). Representados os três ensaios cada um com 6 réplicas. B - Percentagem de sobrevivência calculada por microscopia ótica (MO) ( $P\%DHA/P\% C \times 100$ ) (barra branca) e por fluorescência de Rh123 ( $RFUsDHA/RFUs C \times 100$ ) (barra cinzenta).**

**Tabela IV-1 – Comparação dos valores de sobrevivência obtidos para três métodos diferentes.**

	3D7		
	MO	SGI	Rh123
% sobrevivência – E1	2,46	9,63	58,35
% sobrevivência – E2	1,03	7,54	58,52
% sobrevivência – E3	1,38	6,13	50,24
Média % sobrevivência	1,62	7,77	55,70
Desvio padrão	0,74	1,76	4,73
<i>p-value*</i>		0,1	0,1

\*Mann Whitney; MO - microscopia ótica; SGI – SYBR Green I; Rh123 – Rodamina 123

Na tabela IV-1 são apresentados dados de três ensaios diferentes (E1, E2 e E3) realizados com a estirpe 3D7 de *P. falciparum*. Para cada ensaio a percentagem de sobrevivência foi calculada através de microscopia ótica, fluorescência de SYBR Green I e fluorescência de Rh123. A tabela IV-1 mostra que não existe diferença estatisticamente significativa entre os valores calculados entre cada um dos métodos ( $p > 0,05$ , Mann-Whitney). No entanto, os métodos fluorimétricos sobrestimam a percentagem de sobrevivência.

### **4. Avaliação da viabilidade dos parasitas através atividade metabólica**

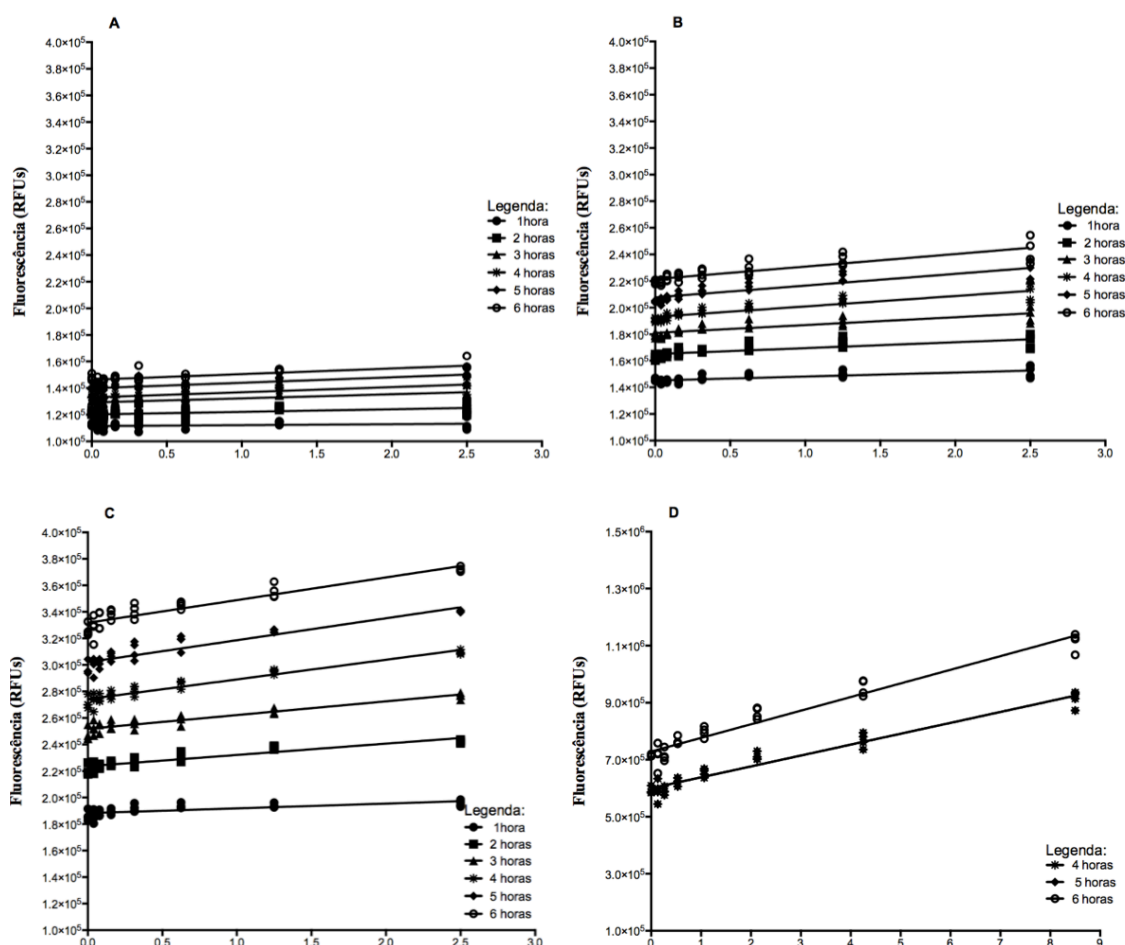
#### **4.1 Determinação da viabilidade com resazurina**

##### ***4.1.1 Avaliação da linearidade do sinal de fluorescência e o valor $Z'$ do ensaio***

Foi analisada a relação entre a parasitemia e a intensidade da fluorescência da RZN, através de uma regressão linear a partir da qual foram determinados os valores do declive e de  $r^2$ , para estabelecer o perfil de linearidade. Verificou-se que existe uma relação linear positiva do aumento da fluorescência com a parasitemia, com um ajustamento de  $r^2 = 0,8504$  para a concentração de  $10 \mu\text{M}$  de RZN. Foi também possível observar que a intensidade da fluorescência aumenta com o tempo de incubação (declive =  $17117 \pm 1311$ , para uma concentração de  $10 \mu\text{M}$ ) (Figura IV-8). Os valores de  $r^2$  e  $Z'$  ( $>0,5$ ) descritos na tabela IV-2 permitem aferir que a partir de 4 horas de incubação com RZN ( $10 \mu\text{M}$ ) o método já apresenta qualidade e robustez para ser validado. No entanto, os valores de eficiência do método são mais elevados ( $r^2 = 0,8504$ , declive =  $17117 \pm 1311$  e  $Z' = 0,5916$ ) com 6 horas de incubação (Tabela IV-2).



## IV - RESULTADOS



**Figura IV-8 – Incubação com resazurina: linha de regressão linear e correspondente  $r^2$  da intensidade de fluorescência, para parasitas da estirpe 3D7 de *P. falciparum* em estágio de anel, ao longo de seis horas e para diferentes parasitêmias. A - Indicadores da performance da incubação com 2,5  $\mu$ M de RZN e parasitemia 0% - 2,5%; B - Indicadores da performance da incubação com 5  $\mu$ M de RZN e parasitemia 0% - 2,5%; C - Indicadores da performance da incubação com 10  $\mu$ M de RZN e parasitemia 0% - 2,5%; D - Indicadores da performance da incubação com 10  $\mu$ M de RZN e parasitemia 0% - 8%.**

## IV – RESULTADOS

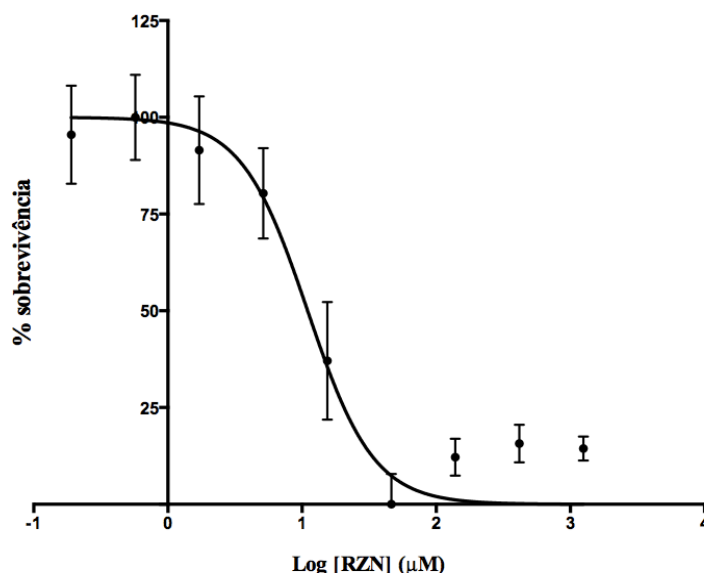
**Tabela IV-2 – Incubação com RZN. Indicadores da performance da incubação com diferentes concentrações de RZN e parasitêmias, ao longo de 6 horas.**

Tempo	1 hora			2 horas			3 horas			4 horas				5 horas				6 horas			
	[ ] (μM)																				
	2,5	5	10	2,5	5	10	2,5	5	10	2,5	5	10	10 *	2,5	5	10	10 *	2,5	5	10	10 *
Declive	669,8 ± 540,0	2973 ± 520,9	3608 ± 713,9	1951 ± 658,3	4419 ± 734,4	8519 ± 726,7	3075 ± 700,0	5877 ± 713,7	10353 ± 814,5	3865 ± 724,6	7824 ± 754,2	14822 ± 811,9	38212 ± 1610	4122 ± 697,9	8842 ± 995,5	16554 ± 1185	38212 ± 1610	4224 ± 788,6	9426 ± 1033	17117 ± 1311	47779 ± 2022
r <sup>2</sup>	0,05	0,52	0,46	0,23	0,55	0,82	0,39	0,69	0,84	0,49	0,78	0,92	0,95	0,54	0,72	0,87	0,95	0,49	0,74	0,85	0,95
Z'	67,46	-0,41	-0,92	-5,73	-0,96	0,29	-3,78	-0,50	0,26	-2,55	-0,26	0,52	0,62	-1,83	-0,13	0,62	0,62	-2,00	-0,50	0,59	0,74
S/N	-0,05	2,40	2,15	0,56	1,97	5,29	0,86	2,49	5,38	1,15	2,91	7,89	10,39	1,41	2,88	8,80	10,39	1,27	2,40	9,51	12,40
S/B	1,00	1,11	1,05	1,02	1,07	1,10	1,03	1,08	1,12	1,05	1,10	1,14	1,54	1,06	1,11	1,15	1,54	1,06	1,11	1,14	1,56

[ ] - concentração; 10 \* - ensaio realizado com parasitêmia 0% - 8%; r<sup>2</sup> – coeficiente de derminação; Z' - factor de desempenho; S/B – signal to background ratio; S/N - signal to noise ratio.

#### 4.1.2 Determinação do $IC_{50}$ da resazurina

Uma vez satisfeitas as condições de eficiência, robustez e sensibilidade do método usando RZN, foi determinada a possível toxicidade da RZN para as formas assexuadas de *P. falciparum*.

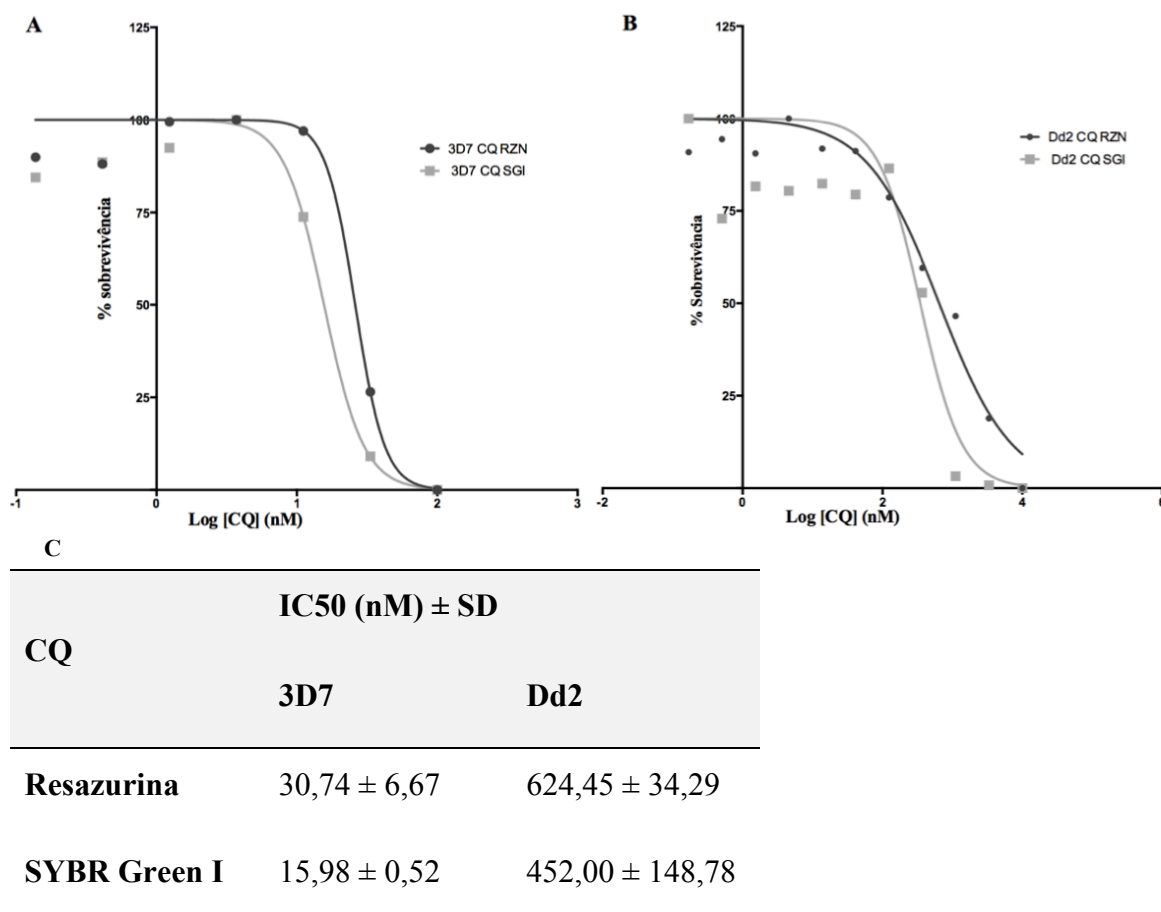


**Figura IV-9 – Curva dose – resposta em função do logaritmo das diferentes doses de RZN e  $IC_{50}$  para a estirpe 3D7 de *P. falciparum*.**

Tendo em conta o  $IC_{50}$  obtido (11,01 µM), constatou-se que, a RZN na concentração em teste não é tóxica para as formas assexuadas de *Plasmodium falciparum* (Figura IV.9). Otimizadas as condições de ensaio (10 µM de RZN e 6 horas de incubação em placa transparente) estas foram aplicadas nos ensaios de suscetibilidade a fármacos subsequentemente realizados.

#### 4.1.3 Determinação do $IC_{50}$ da cloroquina para as estirpes 3D7 e Dd2 de *P. falciparum* com resazurina

Os  $IC_{50}$ s determinados para a CQ utilizando RZN são comparáveis com os obtidos com SGI (Figura IV.10 – A e B). Apesar de os valores obtidos com RZN serem mais elevados, mantém-se o mesmo formato de inibição de crescimento com os dois fluoróforos. Os resultados mostram que o  $IC_{50}$  para a CQ na estirpe Dd2 é mais elevado que na estirpe 3D7, tanto com RZN ( $\approx 22,7$  x superior) como com SGI ( $\approx 28,2$  x superior).



**Figura IV-10 – Concentração inibitória da CQ para *P. falciparum*.** Curvas dose resposta representativas, obtidas através do ensaio de suscetibilidade com RZN (linha negra) e SGI (linha cinzenta). **A** – estirpe 3D7; **B** – estirpe Dd2; **C** – média do IC<sub>50</sub> determinada através da intensidade de fluorescência emitida pela RZN e SGI, de ensaios realizados em dias diferentes, ± desvio padrão (SD). Foram realizados 2 ensaios independentes para cada estirpe. CQ – cloroquina; RZN – resazurina; SGI – SYBR Green I.

## 4.2 Aplicação da resazurina para determinação da sobrevivência de *P. falciparum*

### 4.2.1 Determinação da percentagem de sobrevivência das estirpes 3D7 e 1240 de *P. falciparum* com resazurina

Para aferir a eficácia da RZN na determinação da percentagem de sobrevivência de *P. falciparum*, foram calculadas as percentagens de sobrevivência de culturas assíncronas das estirpes 3D7 (sensível à artemisina) e 1240 (resistente à artemisinina) de *P. falciparum*, quando tratadas com 700 nM de DHA por 6 horas.

**Tabela IV-3 – Comparação da % de sobrevivência calculada através da intensidade de fluorescência de RZN e por MO, para as estirpes 3D7 e 1240 de *P. falciparum*.**

Estirpe	3D7		1240	
	MO	RZN	MO	RZN
<b>% sobrevivência</b>				
<b>E1</b>	0,3	18,4	1,7	42,3
<b>E2</b>	0,8	27,4	0,6	42,2
<b>E3</b>	0,5	11,6	2,6	27,6
<b>Média</b>	0,53	19,13	1,63	37,37
<b>Desvio padrão</b>	0,25	7,93	1,00	8,46
<b>p-value*</b>	0,1		0,1	
<b>r</b>	0,5		- 0,5	

MO – microscopia ótica; RZN – resazurina; \* - Mann Whitney; r – coeficiente de correlação de Spearman; E1, E2 e E3 – ensaio 1, ensaio 2 e ensaio 3, respetivamente.

A percentagem de sobrevivência dos parasitas foi determinada comparando a intensidade de fluorescência emitida pela RZN nas culturas tratadas com 700 nM de DHA relativamente às culturas não tratadas. No mesmo ensaio, o grau de desenvolvimento, morfologia e parasitemia, foram também avaliados em esfregaços, corados com Giemsa e observados por microscopia ótica.

Os resultados apresentados na tabela IV-3, mostram que a sobrevivência dos parasitas traduzida pela percentagem de fluorescência das culturas tratadas relativamente às não tratadas foi em média de 19,3% para a estirpe 3D7 e de 37,37% para a estirpe 1240.

Quando comparados os valores de sobrevivência calculados a partir da MO e da intensidade da fluorescência da RZN, verificou-se que a viabilidade dos parasitas estimada usando RZN é superior à estimada por MO, para as duas estirpes de *P. falciparum* (Anexo V). Como podemos observar na tabela IV-3, não existe uma diferença estatisticamente significativa (teste Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ) entre as percentagens de sobrevivência calculadas para a estirpe 3D7 (sensível à ARTs) e a estirpe 1240 (resistente à ARTs).

## **V- DISCUSSÃO/ CONCLUSÃO**

## V – DISCUSSÃO/CONCLUSÃO

A malária provocada por *Plasmodium falciparum* continua a ser das doenças parasitárias mais letais, tendo provocado cerca de 438 mil mortes em 2015 (117).

Neste momento, a artemisinina e os seus derivados são os antimaláricos mais potentes e rápidos no tratamento da malária. A eficácia clínica da ARTS tem vindo a diminuir na região do Grande Mekong, onde há um aumento do tempo de depuração parasitária e dos casos de recrudescência (118,119). Este fenótipo pode explicar-se em parte pela capacidade do parasita, na fase de anel, conseguir interromper o seu desenvolvimento entrando num estado de dormência, do qual é capaz de recuperar após a remoção do fármaco, retomando o seu normal desenvolvimento intraeritrocítico (119,120).

O RSA<sup>0-3h</sup> é um método útil para investigar o mecanismo de resistência à ARTS, no entanto apresenta como inconveniente a morosidade e a necessidade de microscopistas experientes capazes de distinguir parasitas viáveis em pelo menos 10 000 eritrócitos em esfregaços corados com Giemsa, o que em parte torna o método subjetivo (121). No nosso estudo optámos por desenvolver um método de fluorescência, baseado no RSA<sup>0-3h</sup>, capaz de distinguir de forma rápida e sensível os parasitas viáveis. Para isso, avaliámos vários corantes vitais fluorescentes: SYBR Green I, JC-1, rodamina 123 e resazurina. O ensaio RSA<sup>0-3h</sup> otimizado e padronizado para uma placa de 96 poços é uma boa alternativa pois reduz a quantidade de cultura com anéis 0-3h sincronizados necessária, o que o torna aplicável para a realização de um maior número de ensaios de suscetibilidade, bem como para estudos sobre o tempo de duração do período de dormência e recuperação dos parasitas dormentes. Para além de garantir uma economia de reagentes e recursos.

Através da observação microscópica foi possível observar que os parasitas tratados com 700 nM de DHA ou perdem a viabilidade ou se estão viáveis apresentam atraso no desenvolvimento, sendo observáveis formas de anel. O que indica que o parasita entrou num estado de quiescência e interrompeu o seu desenvolvimento. Já os parasitas não tratados com fármaco apresentam-se na forma de esquizontes onde é possível observar a divisão nuclear e hemozoína, refletindo desenvolvimento parasitário.

O corante SYBER Green I cora indiscriminadamente o DNA tanto nos parasitas viáveis, como nas formas picnóticas inviáveis. A simplicidade do método por nós otimizado e descrito em (116) é uma vantagem, no entanto não permite diferenciar com sensibilidade e robustez os parasitas viáveis (121). No nosso trabalho foi possível verificar que a percentagem de sobrevivência determinada por este método é cerca de

10 vezes superior à calculada por microscopia ótica, resultado explicado, pelo fato de ter sido corado o DNA de todos os parasitas tanto nas cultura tratadas (700nM de DHA durante 6 horas) como nas não tratadas, independentemente de estes se encontrarem viáveis ou não.

O corante mitocondrial JC-1 permite detetar a viabilidade dos parasitas através do potencial de membrana da mitocôndria. Os parasitas viáveis, com potencial mitocondrial intato apresentam a mitocôndria corada de vermelho devido à acumulação no seu interior de agregados JC-1. Quando o parasita está morto, sem potencial de membrana mitocondrial, o citoplasma é corado de verde devido aos monómeros JC-1 (5). Corando com JC-1 uma cultura de *P. falciparum* na qual se encontrem parasitas com diferentes estados de viabilidade, estes são facilmente distinguidos, o que torna este método adequado para validação e confirmação de dados obtidos através de outros métodos (como por exemplo SGI), quando utilizado em microscopia de fluorescência. O corante JC-1 não é totalmente específico para a mitocôndria o que o torna pouco adequado para a quantificação da intensidade de fluorescência relativa à função da mitocôndria (122), como foi possível constatar no trabalho por nós realizado.

A utilização da rodamina 123 permite a coloração seletiva de mitocôndrias em células vivas, uma vez que este corante se acumula predominantemente na mitocôndria do parasita (108). No entanto, este corante também se acumula em todo o citoplasma de alguns parasitas, nomeadamente *P. falciparum* (123), fato este que poderá estar relacionado com os valores de sobrevivência sobrestimados por este corante relativamente aos determinados por microscopia ótica. Propusémo-nos desenvolver um método de deteção de viabilidade baseado na quantificação da intensidade de fluorescência de rodamina 123, mas não pôde ser validado pois não apresentou qualidade, robustez e sensibilidade, o que se traduziu pelos valores de  $r^2 < 0,5$  e  $Z' < 0$ .

A resazurina é um indicador redox que pode ser utilizado para determinar o número de células viáveis, que possuem o metabolismo ativo capaz de reduzir a resazurina em resorufina. A quantidade de resorufina produzida é proporcional ao número de células viáveis que podem ser quantificadas através da intensidade de fluorescência (111). Propusémo-nos desenvolver um método de deteção de viabilidade baseado na quantificação da intensidade de fluorescência da resazurina que foi validado pelo fator de desempenho  $Z' > 0,5$  e pela relação  $S/B > 1$ . Para a realização de ensaios futuros foi determinado que deveriam ser utilizados 10  $\mu$ M de resazurina, com um tempo de



## V – DISCUSSÃO/CONCLUSÃO

incubação de 6 horas com base no maior declive e  $r^2$  obtidos para a curva de correlação e o maior fator de desempenho  $Z'$ . Além da robustez deste método, também foi verificada a reprodutibilidade através dos valores de  $IC_{50}$  determinados de forma consistente para a cloroquina (estirpes 3D7 e Dd2 de *P. falciparum*) em diferentes ensaios. Os valores de  $IC_{50}$  são comparáveis com os valores obtidos com SYBR Green I, apesar de os valores obtidos com RZN estarem sobrestimados. A aplicação deste método à monitorização da sobrevivência dos parasitas ainda está numa fase precoce mas, os resultados obtidos até à data indicam que a viabilidade dos parasitas é sobrestimada com este método. Tendo em conta que os valores de  $IC_{50}$  determinados também são superiores aos obtidos com SYBR Green I devem prosseguir-se os estudos com este método, para clarificar a sua robustez e sensibilidade, para diferenciar parasitas viáveis. Contudo, este fluoróforo é capaz de quantificar a viabilidade, pois há uma diferença entre os valores determinados para a estirpe 3D7 (sensível à ARTs) e a 1240 (resistente à ARTs). Sendo que a percentagem de sobrevivência é em média 19,13% para a estirpe 3D7 e 37,37 % para a estirpe 1240 de *P. falciparum*.

Em conclusão, foi otimizado um ensaio de viabilidade de *P. falciparum* em placa de 96 poços, baseado no ensaio RSA<sup>0-3h</sup>. O formato de ensaio otimizado permite incluir várias réplicas possibilitando o controlo do erro experimental introduzido pelas manipulações sucessivas, a redução de custos e facilitar a realização de um maior número de ensaios simultâneos. A resazurina demonstrou ser uma ferramenta aplicável para os ensaios de suscetibilidade e de viabilidade de *P. falciparum* a fármacos. Para uma concentração de 10  $\mu$ M e um período de incubação de 6 horas, este fluoróforo apresenta reprodutibilidade e robustez com uma eficiência de desempenho  $Z' > 0,5$  e valores de  $IC_{50}$  da cloroquina consistentes para as estirpes 3D7 e Dd2 de *Plasmodium falciparum*. A resazurina apresenta vantagens em relação a outros corantes vitais como SYBR Green I, JC-1 e rodamina 123 pois é mais barata, não é tóxica para as formas assexuadas de *P. falciparum* (10  $\mu$ M), não é radioativa, permite obter de forma simples (um único passo) resultados reprodutíveis e sensíveis que podem ser utilizados em estudos de larga escala, e pode ser aplicada simultaneamente com outros métodos. Os ensaios com resazurina podem ser adaptados para estudos de campo, permitindo uma melhor avaliação e compreensão da resistência à artemisinina e derivados.

## **VI- BIBLIOGRAFIA**

## VI – BIBLIOGRAFIA

1. WHO, UNICEF, Roll Back Malaria. World Malaria Report 2005 [Internet]. 2005. Obtido de: [http://www.rollbackmalaria.org/files/files/resources/WMReport\\_lr.pdf](http://www.rollbackmalaria.org/files/files/resources/WMReport_lr.pdf)
2. WHO | Update on artemisinin resistance - January 2014 [Internet]. WHO. [citado 6 de Janeiro de 2016]. Obtido de: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/update-artemisinin-resistance-jan2014/en/>
3. Noedl H, Wongsrichanalai C, Wernsdorfer WH. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. Trends Parasitol. Abril de 2003;19(4):175–81.
4. Witkowski B, Menard D, Amaratunga C, Fairhurst RM. Ring-stage Survival Assays (RSA) to evaluate the in-vitro and ex-vivo susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artemisinins [Internet]. Institute Pasteur du Cambodge - National Institutes of Health Procedure; Obtido de: <http://www.wwarn.org/sites/default/files/attachments/procedures/INV10-Standard-Operating-Procedure-Ring-Stage-Survival-Assays-v1.2.pdf>
5. Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, et al. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. Lancet Infect Dis. Dezembro de 2013;13(12):1043–9.
6. van Dooren GG, Marti M, Tonkin CJ, Stimmler LM, Cowman AF, McFadden GI. Development of the endoplasmic reticulum, mitochondrion and apicoplast during the asexual life cycle of *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol. Julho de 2005;57(2):405–19.
7. Neves D, Melo A, Linardi P, Vitor R. Parasitologia Humana. 11<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu; 2005. 143-161 p.
8. Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, et al. Two Nonrecombining Sympatric Forms of the Human Malaria Parasite *Plasmodium ovale* Occur Globally. J Infect Dis. 15 de Maio de 2010;201(10):1544–50.
9. Rojo-Marcos G, Rubio-Muñoz JM, Ramírez-Olivencia G, García-Bujalance S, Elcuaz-Romano R, Díaz-Menéndez M, et al. Comparison of Imported *Plasmodium ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* Infections among Patients in Spain, 2005–2011. Emerg Infect Dis [Internet]. Março de 2014 [citado 10 de Setembro de 2015];20(3). Obtido de: [http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/3/13-0745\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/3/13-0745_article.htm)
10. Tuteja R. Malaria - an overview. FEBS J. Setembro de 2007;274(18):4670–9.

## VI – BIBLIOGRAFIA

11. WHO | Achieving the malaria MDG target: reversing the incidence of malaria 2000–2015 [Internet]. WHO. [citado 1 de Janeiro de 2016]. Obtido de: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241509442/en/>
12. WHO | Update on artemisinin and ACT resistance – September 2015 [Internet]. WHO. [citado 20 de Outubro de 2015]. Obtido de: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/update-artemisinin-resistance-sep2015/en/>
13. Despommier D, Gwadz R, Hotez P, Knirsch P. The Malaria in :Parasitic diseases. 5ª edição. New York: Apple Trees Productions; 2005. 50 - 68 p.
14. Chiodini P, Moody A, Manser. Atlas of Medical Helminthology and Protozoology. 4ª edição. London: Churchill Livingstone; 2001. 61 - 69 p.
15. Kappe SHI, Kaiser K, Matuschewski K. The Plasmodium sporozoite journey: a rite of passage. Trends Parasitol. Março de 2003;19(3):135–43.
16. Krotoski WA. Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1985;79(1):1–11.
17. Sturm A, Amino R, van de Sand C, Regen T, Retzlaff S, Rennenberg A, et al. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. Science. 1 de Setembro de 2006;313(5791):1287–90.
18. Baer K, Klotz C, Kappe SHI, Schnieder T, Frevert U. Release of Hepatic *Plasmodium yoelii* Merozoites into the Pulmonary Microvasculature. PLoS Pathog. 9 de Novembro de 2007;3(11):e171.
19. Hafalla JC, Silvie O, Matuschewski K. Cell biology and immunology of malaria. Immunol Rev. 1 de Março de 2011;240(1):297–316.
20. Fowler RE, Fookes RE, Lavin F, Bannister LH, Mitchell GH. Microtubules in *Plasmodium falciparum* merozoites and their importance for invasion of erythrocytes. Parasitology. Novembro de 1998;117 ( Pt 5):425–33.
21. Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege J. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. J Cell Biol. Abril de 1978;77(1):72–82.
22. A diagram summarising the... - Yale Image Finder [Internet]. [citado 5 de Janeiro de 2016]. Obtido de: <http://krauthammerlab.med.yale.edu/imagefinder/Figure.external?sp=SPMC2518119%2Fpone.0003085.g007&state:Figure=BrO0ABXcRAAAAAQAACmRvY3VtZW50SWRzcgARamF2YS5sYW5nLkludGVnZXIS4qCk94GHOAIAAUkABXZhb>

HVleHIAEGphdmEubGFuZy5OdW1iZXKGrJUdC5TgiwIAAHhwAAK8rw%3D  
%3D

23. M A, E N, Y N, M A. Surface charge of *Plasmodium falciparum* merozoites as revealed by atomic force microscopy with surface potential spectroscopy. Parasitol Res. 2002;16–20.
24. Rathore D, Jani D, Nagarkatti R, Kumar S. Heme detoxification and antimalarial drugs – Known mechanisms and future prospects. Drug Discov Today Ther Strateg. 2006;3(2):153–8.
25. Lew VL, Tiffert T, Ginsburg H. Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells. Blood. 15 de Maio de 2003;101(10):4189–94.
26. Papalexis V, Siomos MA, Campanale N, Guo X, Kocak G, Foley M, et al. Histidine-rich protein 2 of the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, is involved in detoxification of the by-products of haemoglobin degradation. Mol Biochem Parasitol. Junho de 2001;115(1):77–86.
27. Imlay JA, Linn S. Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. J Bacteriol. Julho de 1987;169(7):2967–76.
28. Olliaro P. Drug Resistance Hampers Our Capacity to Roll Back Malaria. Clin Infect Dis. 15 de Agosto de 2005;41(Supplement 4):S247–57.
29. Weissbuch I, Leiserowitz L. Interplay Between Malaria, Crystalline Hemozoin Formation, and Antimalarial Drug Action and Design. Chem Rev. 12 de Novembro de 2008;108(11):4899–914.
30. WHO | World Malaria Report 2010 [Internet]. WHO. 2010. Obtido de: [http://www.who.int/malaria/world\\_malaria\\_report\\_2010/worldmalariareport2010.pdf](http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2010/worldmalariareport2010.pdf)
31. WHO. WHO | Guidelines for the treatment of malaria [Internet]. WHO. 2010. Obtido de: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s19105en/s19105en.pdf>
32. WHO | Overview of malaria treatment [Internet]. WHO. [citado 3 de Outubro de 2015]. Obtido de: <http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/en/>
33. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. A. Méndez -Vilas. Vol. volume 1. Espanha: A. Méndez-Vilas; 2013. 269 - 282 p.
34. Sanchez CP, Stein WD, Lanzer M. Dissecting the components of quinine accumulation in *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol. 1 de Março de 2008;67(5):1081–93.

## VI – BIBLIOGRAFIA

35. Ridley RG. Malaria: Dissecting chloroquine resistance. *Curr Biol*. 5 de Julho de 1998;8(10):R346–9.
36. WHO. WHO briefing on Malaria Treatment Guidelines and artemisinin monotherapies [Internet]. 2006. Obtido de: [http://www.who.int/malaria/publications/atoz/meeting\\_briefing19april.pdf](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/meeting_briefing19april.pdf)
37. Baird JK, Rieckmann KH. Can primaquine therapy for vivax malaria be improved? *Trends Parasitol*. Março de 2003;19(3):115–20.
38. Strother A, Fraser IM, Allahyari R, Tilton BE. Metabolism of 8-aminoquinoline antimalarial agents. *Bull World Health Organ*. 1981;59(3):413–25.
39. Petersen I, Eastman R, Lanzer M. Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health. *FEBS Lett*. 6 de Junho de 2011;585(11):1551–62.
40. Kitchen LW, Vaughn DW, Skillman DR. Role of US Military Research Programs in the Development of US Food and Drug Administration–Approved Antimalarial Drugs. *Clin Infect Dis*. 1 de Julho de 2006;43(1):67–71.
41. Palmer KJ, Holliday SM, Brogden RN. Mefloquine. A review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*. Março de 1993;45(3):430–75.
42. Croft SL, Duparc S, Arbe-Barnes SJ, Craft JC, Shin C-S, Fleckenstein L, et al. Review of pyronaridine anti-malarial properties and product characteristics. *Malar J*. 9 de Agosto de 2012;11:270.
43. Vale N, Moreira R, Gomes P. Quimioterapia da malária- um século no desenvolvimento de antimaláricos. 2005;99:57–69.
44. Meshnick SR, Yang YZ, Lima V, Kuypers F, Kamchonwongpaisan S, Yuthavong Y. Iron-dependent free radical generation from the antimalarial agent artemisinin (qinghaosu). *Antimicrob Agents Chemother*. 1 de Maio de 1993;37(5):1108–14.
45. Klayman DL. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*. 31 de Maio de 1985;228(4703):1049–55.
46. Borstnik K, Paik I, Shapiro TA, Posner GH. Antimalarial chemotherapeutic peroxides: artemisinin, yingzhaosu A and related compounds. *Int J Parasitol*. 4 de Dezembro de 2002;32(13):1661–7.
47. Krishna S, Uhlemann A-C, Haynes RK. Arteminins: mechanisms of action and potential resistance. *Drug Resist Updat*. 2004;7:233–44.

## VI – BIBLIOGRAFIA

48. Farrar J, Hotez P, Junghanss T, Kang G, Lalloo D, White NJ. Manson's Tropical Diseases. Elsevier Health Sciences; 2013. 580 - 584 p.
49. White NJ. Antimalarial drug resistance. J Clin Invest. 15 de Abril de 2004;113(8):1084–92.
50. Woodrow C, Haynes R, Krishna S. Artemisinins. Postgrad Med J. Fevereiro de 2005;81(952):71–8.
51. Gopalakrishnan AM, Kumar N. Antimalarial Action of Artesunate Involves DNA Damage Mediated by Reactive Oxygen Species. Antimicrob Agents Chemother. 27 de Outubro de 2014;59(1):317–25.
52. Selmeczi K, Robert A, Claparols C, Meunier B. Alkylation of human hemoglobin A0 by the antimalarial drug artemisinin. FEBS Lett. 2 de Janeiro de 2004;556(1–3):245–8.
53. Kannan R, Kumar K, Sahal D, Kukreti S, Chauhan VS. Reaction of artemisinin with haemoglobin: implications for antimalarial activity. Biochem J. 15 de Janeiro de 2005;385(Pt 2):409–18.
54. Messori L, Gabbiani C, Casini A, Siragusa M, Vincieri FF, Bilia AR. The reaction of artemisinins with hemoglobin: A unified picture. Bioorg Med Chem. 1 de Maio de 2006;14(9):2972–7.
55. Neha Pandey SP-R. Updates on artemisinin: an insight to mode of actions and strategies for enhanced global production. Protoplasma. 2015;
56. Zhang S, Gerhard GS. Heme activates artemisinin more efficiently than hemin, inorganic iron, or hemoglobin. Bioorg Med Chem. 15 de Agosto de 2008;16(16):7853–61.
57. O'Neill PM, Barton VE, Ward SA. The Molecular Mechanism of Action of Artemisinin—The Debate Continues. Molecules. 12 de Março de 2010;15(3):1705–21.
58. Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, Van Goethem IDA, East JM, Lee AG, Kimura M, et al. Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. Nature. 21 de Agosto de 2003;424(6951):957–61.
59. Shandilya A, Chacko S, Jayaram B, Ghosh I. A plausible mechanism for the antimalarial activity of artemisinin: A computational approach. Sci Rep [Internet]. 29 de Agosto de 2013 [citado 19 de Abril de 2016];3. Obtido de: <http://www.nature.com/articles/srep02513>

## VI – BIBLIOGRAFIA

60. Krishna S, Woodrow CJ, Staines HM, Haynes RK, Mercereau-Puijalon O. Re-evaluation of how artemisinins work in light of emerging evidence of in vitro resistance. *Trends Mol Med*. Maio de 2006;12(5):200–5.
61. Wang J, Huang L, Li J, Fan Q, Long Y, Li Y, et al. Artemisinin Directly Targets Malarial Mitochondria through Its Specific Mitochondrial Activation. *PLoS ONE*. 8 de Março de 2010;5(3):e9582.
62. Sun C, Cao Y, Long G, Zhou B. Two distinct and competitive pathways confer the cellcidal actions of artemisinins. *Microb Cell*. 5 de Janeiro de 2015;2(1):14–25.
63. Gopalakrishnan A, Panicker VP. An update on artemisinin- A multifaceted drug. *Int J PharmTech Res*. 6(4):1354–61.
64. Hartwig CL, Rosenthal AS, Angelo JD, Griffin CE, Posner GH, Cooper RA. Accumulation of artemisinin trioxane derivatives within neutral lipids of *Plasmodium falciparum* malaria parasites is endoperoxide-dependent. *Biochem Pharmacol*. 1 de Fevereiro de 2009;77(3):322–36.
65. Robert A, Benoit-Vical F, Claparols C, Meunier B. The antimalarial drug artemisinin alkylates heme in infected mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 de Setembro de 2005;102(38):13676–80.
66. Robert A, Coppel Y, Meunier B. Alkylation of heme by the antimalarial drug artemisinin. *Chem Commun*. 27 de Fevereiro de 2002;(5):414–5.
67. Robert A, Meunier B. Is alkylation the main mechanism of action of the antimalarial drug artemisinin? *Chem Soc Rev*. 1 de Janeiro de 1998;27(4):273–4.
68. Cazelles J, Robert A, Meunier B. Alkylating Capacity and Reaction Products of Antimalarial Trioxanes after Activation by a Heme Model. *J Org Chem*. 1 de Fevereiro de 2002;67(3):609–19.
69. Loup C, Lelièvre J, Benoit-Vical F, Meunier B. Trioxaquinones and heme-artemisinin adducts inhibit the in vitro formation of hemozoin better than chloroquine. *Antimicrob Agents Chemother*. Outubro de 2007;51(10):3768–70.
70. del Pilar Crespo M, Avery TD, Hanssen E, Fox E, Robinson TV, Valente P, et al. Artemisinin and a Series of Novel Endoperoxide Antimalarials Exert Early Effects on Digestive Vacuole Morphology. *Antimicrob Agents Chemother*. Janeiro de 2008;52(1):98–109.
71. Berman PA, Adams PA. Artemisinin enhances heme-catalysed oxidation of lipid membranes. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(7):1283–8.



## VI – BIBLIOGRAFIA

72. Hastings IM, Donnelly MJ. The impact of antimalarial drug resistance mutations on parasite fitness, and its implications for the evolution of resistance. *Drug Resist Updat*. Fevereiro de 2005;8(1-2):43-50.
73. WHO | Antimalarial drug resistance [Internet]. WHO. [citado 13 de Outubro de 2015]. Obtido de: [http://www.who.int/malaria/areas/drug\\_resistance/overview/en/](http://www.who.int/malaria/areas/drug_resistance/overview/en/)
74. Wongsrichanalai C, Pickard AL, Wernsdorfer WH, Meshnick SR. Epidemiology of drug-resistant malaria. *Lancet Infect Dis*. Abril de 2002;2(4):209-18.
75. D&apos UD. History and importance antimalarial drug resistance. *Trop Med Amp Int Health*. 2001;6(11):845-8.
76. Sanchez CP, Dave A, Stein WD, Lanzer M. Transporters as mediators of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol*. 15 de Agosto de 2010;40(10):1109-18.
77. A P-glycoprotein homologue of *Plasmodium falciparum* is localized on the digestive vacuole. *J Cell Biol*. 1 de Junho de 1991;113(5):1033-42.
78. Plowe CV. Monitoring antimalarial drug resistance: making the most of the tools at hand. *J Exp Biol*. 1 de Novembro de 2003;206(21):3745-52.
79. Bloland PB. Drug resistance in malaria [Internet]. WHO; 2001. Obtido de: [http://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/drug\\_resistance/bloland\\_who2001.pdf](http://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/drug_resistance/bloland_who2001.pdf)
80. Triglia T, Menting JGT, Wilson C, Cowman AF. Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci*. 9 de Dezembro de 1997;94(25):13944-9.
81. Looareesuwan S, Chulay JD, Canfield CJ, Hutchinson DB. Malarone (atovaquone and proguanil hydrochloride): a review of its clinical development for treatment of malaria. Malarone Clinical Trials Study Group. *Am J Trop Med Hyg*. 1 de Abril de 1999;60(4):533-41.
82. Fleck SL, Pudney M, Sinden RE. The effect of atovaquone (566C80) on the maturation and viability of *Plasmodium falciparum* gametocytes in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. Junho de 1996;90(3):309-12.
83. Ittarat I, Asawamahasakda W, Meshnick SR. The effects of antimalarials on the *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase. *Exp Parasitol*. Agosto de 1994;79(1):50-6.
84. Arie F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A-C, Khim N, et al. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 2 de Janeiro de 2014;505(7481):50-5.

## VI – BIBLIOGRAFIA

85. Anderson TJC, Williams JT, Nair S, Sudimack D, Barends M, Jaidee A, et al. Inferred relatedness and heritability in malaria parasites. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 22 de Agosto de 2010;277(1693):2531–40.
86. Sibley CH. Understanding drug resistance in malaria parasites: Basic science for public health. *Mol Biochem Parasitol*. Julho de 2014;195(2):107–14.
87. Straimer J, Gnädig NF, Witkowski B, Amaratunga C, Duru V, Ramadani AP, et al. K13-propeller mutations confer artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Science*. 23 de Janeiro de 2015;347(6220):428–31.
88. Keum Y-S, Choi BY. Molecular and chemical regulation of the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol Basel Switz*. 2014;19(7):10074–89.
89. Mbengue A, Bhattacharjee S, Pandharkar T, Liu H, Estiu G, Stahelin RV, et al. A molecular mechanism of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*. 30 de Abril de 2015;520(7549):683–7.
90. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonen A-L. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol*. 2013;1(1):45–9.
91. Paloque L, Ramadani AP, Mercereau-Puijalon O, Augereau J-M, Benoit-Vical F. *Plasmodium falciparum*: multifaceted resistance to artemisinins. *Malar J*. 2016;15:149.
92. WHO. WHO | Guidelines for the treatment of malaria [Internet]. WHO. 2015 [citado 9 de Agosto de 2015]. Obtido de: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>
93. Fidock DA, Eastman RT, Ward SA, Meshnick SR. Recent highlights in antimalarial drug resistance and chemotherapy research. *Trends Parasitol*. Dezembro de 2008;24(12):537–44.
94. Anderson TJC, Nair S, Nkhoma S, Williams JT, Imwong M, Yi P, et al. High heritability of malaria parasite clearance rate indicates a genetic basis for artemisinin resistance in western Cambodia. *J Infect Dis*. 1 de Maio de 2010;201(9):1326–30.
95. Carrara VI, Zwang J, Ashley EA, Price RN, Stepniewska K, Barends M, et al. Changes in the Treatment Responses to Artesunate-Mefloquine on the Northwestern Border of Thailand during 13 Years of Continuous Deployment. *PLoS ONE*. 23 de Fevereiro de 2009;4(2):e4551.

## VI – BIBLIOGRAFIA

96. Organization WH. Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. 2010 [citado 30 de Novembro de 2015]; Obtido de: <http://www.who.int/iris/handle/10665/44449>
97. Nogueira F, Rosário VE do. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. Rev Pan-Amaz Saúde. Setembro de 2010;1(3):109–24.
98. Dondorp AM, Nosten F, Yi P, Das D, Phyo AP, Tarning J, et al. Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. N Engl J Med. 30 de Julho de 2009;361(5):455–67.
99. Deponte M. Mitochondrial Protein Import in Malaria Parasites. Em: Hommel M, Kremsner PG, editores. Encyclopedia of Malaria [Internet]. Springer New York; 2013 [citado 11 de Dezembro de 2015]. p. 1–13. Obtido de: [http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-4614-8757-9\\_95-1](http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-1-4614-8757-9_95-1)
100. Ha YR, Hwang B-G, Hong Y, Yang H-W, Lee SJ. Effect of Farnesyltransferase Inhibitor R115777 on Mitochondria of *Plasmodium falciparum*. Korean J Parasitol. Agosto de 2015;53(4):421–30.
101. Peatey CL, Chavchich M, Chen N, Gresty KJ, Gray K-A, Gatton ML, et al. A small subset of artemisinin induced dormant *P. falciparum* parasites maintain mitochondrial membrane potential and resume growth in vitro. J Infect Dis. 29 de Janeiro de 2015;jiv048.
102. Johnson JD, Dennull RA, Gerena L, Lopez-Sanchez M, Roncal NE, Waters NC. Assessment and Continued Validation of the Malaria SYBR Green I-Based Fluorescence Assay for Use in Malaria Drug Screening. Antimicrob Agents Chemother. 1 de Junho de 2007;51(6):1926–33.
103. ThermoFisher. SYBR® Green I Nucleic Acid Gel Stain - 10,000X concentrate in DMSO [Internet]. ThermoFisher Scientific Inc. 2015 [citado 6 de Janeiro de 2016]. Obtido de: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/S7563>
104. Rathore S, Jain S, Sinha D, Gupta M, Asad M, Srivastava A, et al. Disruption of a mitochondrial protease machinery in *Plasmodium falciparum* is an intrinsic signal for parasite cell death. Cell Death Dis. 24 de Novembro de 2011;2(11):e231.
105. Engelbrecht D, Durand PM, Coetzer TL, Engelbrecht D, Durand PM, Coetzer TL. On Programmed Cell Death in *Plasmodium falciparum*: Status Quo, On Programmed Cell Death in *Plasmodium falciparum*: Status Quo. J Trop Med J Trop Med. 12 de Janeiro de 2012;2012, 2012:e646534.

## VI – BIBLIOGRAFIA

106. Pasini EM, Ierssel D van den, Vial HJ, Kocken CH. A novel live-dead staining methodology to study malaria parasite viability. *Malar J.* 7 de Junho de 2013;12(1):190.
107. Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J Cell Biol.* 1 de Março de 1981;88(3):526–35.
108. Benel L, Ronot X, Kornprobst M, Adolphe M, Mounolou JC. Mitochondrial uptake of rhodamine 123 by rabbit articular chondrocytes. *Cytometry.* Maio de 1986;7(3):281–5.
109. Johnson LV, Walsh ML, Chen LB. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Fevereiro de 1980;77(2):990–4.
110. Reader J, Botha M, Theron A, Lauterbach SB, Rossouw C, Engelbrecht D, et al. Nowhere to hide: interrogating different metabolic parameters of *Plasmodium falciparum* gametocytes in a transmission blocking drug discovery pipeline towards malaria elimination. *Malar J.* 22 de Maio de 2015;14(1):213.
111. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. Cell Viability Assays. Em: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, Arkin M, Auld D, Austin C, et al., editores. *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004 [citado 27 de Dezembro de 2015]. Obtido de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
112. Trager W, Jensen JB. Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* 20 de Agosto de 1976;193(4254):673–5.
113. Lambros C, Vanderberg JP. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol.* Junho de 1979;65(3):418–20.
114. Trang DT, Huy NT, Kariu T, Tajima K, Kamei K. One-step concentration of malarial parasite-infected red blood cells and removal of contaminating white blood cells. *Malar J.* 17 de Março de 2004;3(1):7.
115. Zhang J-H, Chung TDY, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen.* 1 de Abril de 1999;4(2):67–73.
116. Machado M, Murtinheira F, Nogueira F. Whole-cell SYBR Green I assay for antimalarial activity assessment. *Clin Med Microbiol.* in press.
117. WHO | World Malaria Report 2015 [Internet]. WHO. [citado 26 de Dezembro de 2015]. Obtido de: <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>

## VI – BIBLIOGRAFIA

118. Xie SC, Dogovski C, Kenny S, Tilley L, Klonis N. Optimal assay design for determining the in vitro sensitivity of ring stage *Plasmodium falciparum* to artemisinins. *Int J Parasitol.* 15 de Outubro de 2014;44(12):893–9.
119. Teuscher F, Gatton ML, Chen N, Peters J, Kyle DE, Cheng Q. Artemisinin-Induced Dormancy in *Plasmodium falciparum*: Duration, Recovery Rates, and Implications in Treatment Failure. *J Infect Dis.* 1 de Novembro de 2010;202(9):1362–8.
120. Witkowski B, Lelièvre J, Barragán MJL, Laurent V, Su X, Berry A, et al. Increased tolerance to artemisinin in *Plasmodium falciparum* is mediated by a quiescence mechanism. *Antimicrob Agents Chemother.* Maio de 2010;54(5):1872–7.
121. Amaratunga C, Neal AT, Fairhurst RM. Flow Cytometry-Based Analysis of Artemisinin-Resistant *Plasmodium falciparum* in the Ring-Stage Survival Assay. *Antimicrob Agents Chemother.* Agosto de 2014;58(8):4938–40.
122. Chen LB. Fluorescent labeling of mitochondria. *Methods Cell Biol.* 1989;29:103–23.
123. Tanabe K, Murakami K. Reduction in the mitochondrial membrane potential of *Toxoplasma gondii* after invasion of host cells. *J Cell Sci.* Agosto de 1984;70:73–81.
124. Aikawa M, Miller LH, Johnson J, Rabbege J. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J Cell Biol.* Abril de 1978;77(1):72–82.

## **VII- ANEXOS**

## Ring Survival Assay 0 – 3 horas

**Ring-stage Survival Assays (RSA) to evaluate the *in-vitro* and *ex-vivo* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artemisinin**

Procedure

**Suggested citation:** B Witkowski, D Menard, C Amaratunga, RM Fairhurst. Ring-stage Survival Assays (RSA) to evaluate the *in-vitro* and *ex-vivo* susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artemisinins. Institute Pasteur du Cambodge – National Institutes of Health Procedure RSAv1.

**Procedure ID:** RSAv1

**Developed by:**

- Benoit Witkowski & Didier Ménard, Unité d’Epidémiologie Moléculaire du Paludisme, Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, Cambodia
- Chanaki Amaratunga & Rick M. Fairhurst, Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases/NIH, Rockville, Maryland, USA

**Version History**

Version number	Revision(s) & reason for amendment	Release date
1.0	Creation of procedure	11 September 2013

**For more information, contact:**

[bwitkowski@pasteur-kh.org](mailto:bwitkowski@pasteur-kh.org)

[dmenard@pasteur-kh.org](mailto:dmenard@pasteur-kh.org)

[amaratungac@niaid.nih.gov](mailto:amaratungac@niaid.nih.gov)

[rfairhurst@niaid.nih.gov](mailto:rfairhurst@niaid.nih.gov)



## Contents

<b>1. Purpose</b>	<b>4</b>
<b>2. Scope</b>	<b>4</b>
<b>3. Abbreviations</b>	<b>4</b>
<b>4. Duties and Responsibilities</b>	<b>5</b>
<b>5. Materials and Equipment</b>	<b>5</b>
5.1. Materials	5
5.2. Equipment	6
<b>6. Procedure</b>	<b>6</b>
6.1. Aseptic procedures	6
6.2. Reagent preparation	6
6.2.1. Preparation of culture medium	6
6.2.2. Preparation of DHA solution	7
6.2.3. Preparation of uninfected red blood cells	7
6.2.4. Preparation of 5% sorbitol solution	7
6.2.5. Preparation of Percoll® solution	8
6.2.6. Preparation of Giemsa stain	8
6.3. Collection and preparation of blood from malaria patients	8
6.3.1. Sample collection	8
6.3.2. Sample preparation	8
6.3.3. Preparation of <i>P. falciparum</i> samples for long-term storage	9
6.4. In-vitro culture adaptation	9
6.4.1. Freshly-collected samples	9
6.4.2. Cryopreserved samples	9
6.5. Ex-vivo RSA	10
6.5.1. Preparation of <i>P. falciparum</i> sample and drug solution	10
6.5.2. Ex-vivo RSA	10
6.6. In-vitro RSA <sup>0-3h</sup>	11
6.6.1. Preparation of 0-3 hour post-invasion rings	11
6.6.2. Preparation of <i>P. falciparum</i> sample and drug solution	12
6.6.3. In-vitro RSA <sup>0-3h</sup>	13
6.7. Microscopic examination to determine parasite survival rates	13
<b>7. References</b>	<b>14</b>

## 1. Purpose

This procedure describes two assays to evaluate the susceptibility of *Plasmodium falciparum* to artemisinins. The ***in-vitro* Ring-stage Survival Assay (RSA<sup>0-3h</sup>)** is performed on 0-3 hour post-invasion rings obtained from culture-adapted parasites. The ***ex-vivo* Ring-stage Survival Assay (*ex-vivo* RSA)** is performed on parasite isolates freshly collected from patients with malaria. In both assays, parasites are exposed to 700 nM dihydroartemisinin (DHA) for 6 hours – approximating their drug exposure in patients treated with an artemisinin – and their survival is assessed 72 hours later as described in Witkowski, Amaratunga et al. 2013 (1), with minor modifications.

## 2. Scope

This procedure details the steps required to determine the percentage of viable parasites at 72 hours, following a 700-nM, 6-hour pulse of DHA. Samples suitable for testing are either adapted parasite lines (synchronized at the 0-3 hour post-invasion ring stage) in the *in-vitro* RSA<sup>0-3h</sup> or clinical parasite isolates (freshly obtained from patients with malaria and *P. falciparum* mono-infection) in the *ex-vivo* RSA.

## 3. Abbreviations

ACD	acid citrate dextrose
DHA	dihydroartemisinin
DMSO	dimethyl sulfoxide
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PBS	phosphate-buffered saline
QA	quality assurance
QC	quality control
RBC	red blood cell
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSA	ring-stage survival assay
RT	room temperature
WWARN	WorldWide Antimalarial Resistance Network
WBC	white blood cell
L	liter
mL	milliliter
μL	microliter
ng	nanogram
μM	micromolar
nM	nanomolar
μm	micrometer
MW	molecular weight
U	unit

#### 4. Duties and Responsibilities

This procedure is designed for use by appropriately-equipped laboratories that perform *in-vitro* and *ex-vivo* drug susceptibility tests on *P. falciparum*. To perform the procedure successfully, training is required and participation in an appropriate QA/QC proficiency scheme is recommended.

#### 5. Materials and Equipment

##### 5.1. Materials

###### *General*

- Sterile pipettes (2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL)
- Sterile tips (10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL)
- Sterile transfer pipettes
- Cell culture flasks with vented cap (25 cm<sup>2</sup>)
- Cell culture flasks with vented cap (75 cm<sup>2</sup>)
- 48-well culture plates
- Microscope slides
- Microscope slide staining jars
- Centrifuge tubes (15 mL, 50 mL)
- Microcentrifuge tubes (1.5 mL)
- Disposable sterilization filter units, 0.22 µm, 1 L capacity
- 70% ethanol

###### *Blood sample collection*

- ACD Vacutainers® (Becton-Dickinson, #364816)
- BD Vacutainer® Safety-Lok™ Blood Collection Set (Becton-Dickinson, #364815)
- BD Vacutainer® One Use Holder (Becton-Dickinson, #367281)

###### *Parasite culture*

- RPMI-1640 + GlutaMAX™-1 (Gibco, #61870-044) stored at 4°C
- Albumax II (Invitrogen, #11021-037) stored at 4°C
- Sterile human serum (ABO/Rh blood group 0+) stored at –20°C
- RBCs (ABO/Rh blood group 0+) stored at 4°C
- HEPES Buffer solution 1 M (Gibco, #1563-056, 100 mL) stored at 4°C
- Gentamicin solution, 10 mg/mL (Invitrogen, #15710-072) stored at RT
- Hypoxanthine 10 mM (c.c.pro, #Z-41-M, 100 mL) stored at 4°C
- Distilled water for cell culture (Gibco, #10977-035, 500 mL) stored at RT
- Methanol stored at RT
- Giemsa stain (Merck, #1.09204.0500, 500 mL) stored at RT
- Glycerolyte 57 (Baxter, #4A7833) stored at RT

###### *Parasite synchronization*

- 10X PBS (Gibco, #70013-016, 500 mL) stored at RT
- Heparin sodium 5,000 U/mL (Rotexmedica, #3862340) stored at 4°C
- Percoll (Sigma, #P4937) stored at 4°C
- D-sorbitol (Sigma, #S1876) stored at RT

**Ring-stage Survival Assay (RSA)**

- Dihydroartemisinin (provided by WWARN) stored at 4°C
- DMSO (Sigma, #D2650) stored at RT
- Methanol (Sigma, #32213, 1 L) stored at RT
- Rapid Giemsa stain (RAL diagnostics, #BLUE-RAL 555 and #EOSIN-RAL 555) stored at RT
- Giemsa stain (Merck, #1.09204.0500, 500 mL) stored at RT

**5.2. Equipment**

- Pipette
- Micropipettes
- Water-jacketed incubator at 37°C with tri-gas mixture (5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>)
- Class II biosafety cabinet
- Vortex
- Centrifuge with swinging bucket rotor (e.g., Eppendorf 5702)
- Microcentrifuge
- Oil-immersion microscope
- Freezer (–20°C or below)
- Refrigerator
- Water bath
- Weighing balance

**6. Procedure****6.1. Aseptic procedures**

- All procedures (except centrifuging, vortexing, 37°C incubations, and preparing stained blood smears) are performed in a Class II biosafety cabinet, which is wiped down with aseptic solution at the start and end of each day.
- The incubator and storage surfaces are cleaned with aseptic solution at least every 3 months.

**6.2. Reagent preparation****6.2.1. Preparation of culture medium**

- Prepare the culture medium as described in Table 1.
- Use a magnetic stirrer to ensure that components are completely dissolved.
- Heat-inactivate the human serum at 56°C for 30 minutes prior to use.
- After preparation, filter the medium using a 0.22 µm pore size, 1 L filter.
- Store at 4°C for up to 2 weeks.

**Table 1:** Volumes of reagents for 1 L of culture medium

Reagent	Stock solution	Volume/weight
RPMI-1640 medium		928 mL
HEPES	1 M	25 mL
Gentamicin	10 mg/mL	2 mL
Hypoxanthine	10 mM	20 mL
Albumax II		5 g
Heat-inactivated human serum		25 mL

**6.2.2. Preparation of DHA solution**

1. Resuspend the DHA (provided by WWARN as a pre-weighed ~1 mg aliquot) in DMSO to obtain a 1 mg/mL stock solution. Vortex to dissolve completely.
2. Dilute the DHA stock solution 5-fold in DMSO to obtain a 200 µg/mL (700 nM) solution. Vortex.
3. Make 50 µL aliquots in sterile 1.5 mL microcentrifuge tubes.
4. Store at -20°C for up to 6 months.

**6.2.3. Preparation of uninfected red blood cells**

- RBCs are used to lower parasitemia and adjust hematocrit as needed in parasite cultures and RSAs.
- RBCs should test negative for hemoglobinopathies and G6PD deficiency before use.
- Collect whole blood in a 250 mL pouch containing ACD anticoagulant:
  1. Spray the blood pouch with 70% ethanol and let it dry in the biosafety cabinet.
  2. Open carefully by cutting the pouch's tube with sterile scissors.
  3. Transfer the blood into 50 mL centrifuge tubes.
  4. Store at 4°C for up to 3 weeks.
- Before using RBCs in parasite cultures and RSAs:
  1. Rule out hemoglobinopathies and G6PD deficiency.
  2. Centrifuge 25 mL of whole blood at 1000 g for 10 minutes.
  3. Remove the plasma and buffy coat.
  4. Add cold (4°C) RPMI to a final volume of 50 mL.
  5. Centrifuge at 1000 g for 10 minutes.
  6. Remove the supernatant.
  7. Repeat steps 4-6 twice.
  8. Add 3 mL of RPMI to RBC pellet.
  9. Centrifuge at 1000 g for 10 minutes.
  10. Store (without mixing the cells) at 4°C up to 4 days.

**6.2.4. Preparation of 5% sorbitol solution**

1. Add 50 g of D-sorbitol to 1 L of culture water.
2. Stir until completely dissolved.
3. Sterilize the solution using a 0.22 µm pore size, 1 L filter.
4. Store at 4°C up to 1 year.

**6.2.5. Preparation of Percoll® solution**

These steps are done at RT, in a Class II biosafety cabinet, and using sterile reagents.

1. Mix 9 volumes of Percoll with 1 volume of 10X PBS to make Percoll 90% solution. Mix thoroughly. Store at 4°C up to 2 months.
2. Freshly prepare heparinized RPMI by adding 15 µL heparin (5,000 U/mL) to 10 mL RPMI.
3. Freshly prepare Percoll 75% solution by adding 1.5 volumes of heparinized RPMI to 7.5 volumes of Percoll 90% solution.

**6.2.6. Preparation of Giemsa stain**

- Giemsa (Merck) – Add 1 volume of Giemsa to 9 volumes of 0.4% NaCl solution. Stain smears for 20 minutes and rinse.

**Table 2:** Information regarding the storage and shelf-life of reagents

Reagent	Storage temperature	Shelf-life
Culture medium	4°C	2 weeks
Sorbitol 5% solution	4°C	1 year
DHA solution	–20°C	6 months
Percoll® 90% solution	4°C	2 months
Heparinized RPMI	RT	Freshly made
Percoll® 75% solution	RT	Freshly made
Uninfected RBCs in ACD	4°C	3 weeks
Uninfected RBCs for culture	4°C	4 days
Giemsa solution	RT	Freshly made

**6.3. Collection and preparation of blood from malaria patients**

All steps are performed at RT unless otherwise stated. All procedures following blood draw should be performed in a biosafety cabinet to avoid bacterial contamination.

**6.3.1. Sample collection**

- Aseptically draw venous blood into an ACD Vacutainer® using the BD Vacutainer® Safety-Lok™ Blood Collection Set and holder.
- Mix by gently inverting tube 5 times and store the blood at 4°C up to 24 hours.

**6.3.2. Sample preparation**

1. Prepare a thin blood smear using a drop of blood. Stain with Giemsa (section 6.2.6).
2. Evaluate the parasitemia.
3. Centrifuge the blood tube at 800g for 5 minutes.
4. Remove the plasma and the buffy coat.
5. Transfer the RBC pellet to a 50 mL centrifuge tube.
6. Add 20 mL of RPMI (pre-warmed to RT).
7. Centrifuge at 800 g for 5 minutes.
8. Remove the supernatant.
9. Repeat steps 6-8 twice.

The infected RBCs are now ready to be processed for *ex-vivo* RSA, long-term storage

(section 6.3.3), or culture-adaptation (section 6.4).

### **6.3.3. Preparation of *P. falciparum* samples for long-term storage**

This step is optional but provides backup aliquots that can be used years later.

1. In a 50 mL centrifuge tube, add Glycerolyte (3X volume of RBC pellet) drop-wise at RT to the RBC pellet obtained in section 6.3.2.
2. Mix gently with a pipette.
3. Let stand for 1 minute at RT.
4. Distribute 500 µL of the preparation into sterile cryotubes.
5. Freeze at –80°C for at least 18 hours.
6. Transfer vials to liquid nitrogen for long-term storage.

### **6.4. In-vitro culture adaptation**

All steps are performed at RT unless otherwise stated. All procedures are performed in a level II biosafety cabinet to avoid bacterial contamination. **All *P. falciparum* samples are suitable for in-vitro culture adaptation, regardless of parasitemia.**

#### **6.4.1. Freshly-collected samples**

1. Warm culture medium to 37°C in a water bath.
2. Add 5 mL of culture medium to a 25 cm<sup>2</sup> culture flask.
3. Add 150 µL of the infected RBC pellet (section 6.3.2) and 50 µL of uninfected RBCs (section 6.2.3) to achieve a 4% hematocrit.
4. Mix gently.
5. Maintain the culture in an incubator under the following conditions: 37°C, humid atmosphere, 5% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>.
6. Replace 5 mL of culture medium (pre-warmed to 37°C) daily. Check the parasitemia daily by making Giemsa-stained thin blood smears.
  - a. If no or few parasites are detected (< 0.1% of the initial parasitemia), add 50 µL of uninfected RBCs (section 6.2.3) weekly in addition to replacing medium daily. Stop the culture if no parasites are observed in 60 days.
  - b. If parasites are detected and are growing normally (parasitemia increases 1.5- to 10-fold every 48 hours), maintain the parasitemia under 3%. For assays, dilute the pellet with uninfected RBCs to achieve a 0.5-1% parasitemia and add culture medium to obtain a 4% hematocrit.
7. Adaptation is considered successful after 2 weeks of uninterrupted parasite culture.

#### **6.4.2. Cryopreserved samples**

1. Remove a tube containing cryopreserved *P. falciparum* parasites (section 6.3.3) from liquid nitrogen.
2. Thaw the vial in a 37°C water bath. Wear eye-protection. Avoid contact between water and the cap of the tube.
3. After thawing, transfer the solution to a 15 mL centrifuge tube.
4. Centrifuge at 800 g for 5 minutes.
5. Remove the supernatant.
6. Add 1 volume (equal to the initial volume in the cryotube) of 3.5% NaCl solution drop-wise while shaking the tube gently.
7. Let it stand for 1 minute at RT.
8. Add 12 mL of RPMI (pre-warmed to 37°C) and mix gently.

9. Centrifuge at 800 g for 5 minutes.
10. Remove the supernatant.
11. Resuspend the RBCs in 10 mL of culture medium (pre-warmed to 37°C).
12. Transfer to a 25 cm<sup>2</sup> culture flask and add uninfected RBCs to obtain a 2% hematocrit.
13. Maintain the culture in an incubator under these conditions: 37°C, humid atmosphere, 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub>, and follow the procedure in section 6.4.1.

#### 6.5. *Ex-vivo* RSA

All steps are performed at RT unless otherwise stated. All procedures are performed in a sterile biosafety cabinet to avoid bacterial contamination. ***P. falciparum* samples with parasitemia ≥ 0.1% are suitable for this assay.**

##### 6.5.1. Preparation of *P. falciparum* sample and drug solution

- Prepare a parasite solution by adding 50 µL of infected RBCs (section 6.3.2) to 2.5 mL of culture medium.
- If the parasitemia is > 1%, dilute the pellet with uninfected RBCs to obtain a 0.5-1% parasitemia and with culture medium to obtain a 2% hematocrit.
- Make a thin smear (= initial parasitemia, "INI").
- Prepare the DMSO control solution by adding 20 µL of DMSO to 2 mL of culture medium. Prepare the DHA test solution by adding 20 µL of DHA stock solution (section 6.2.2) to 2 mL of culture medium. Mix both solutions by vortexing.
- Do not re-use the thawed aliquot of DHA. Always use a fresh aliquot.

##### 6.5.2. *Ex-vivo* RSA

1. In a 48-well culture plate, add:
  - 100 µL of DMSO solution in the "non-exposed" well and
  - 100 µL of DHA solution in "DHA-exposed" well.
2. Add 900 µL of infected RBC suspension to each well.
3. Mix gently with pipette while avoiding contact between wells.
4. Maintain the 48-well culture plate in an incubator under these conditions: 37°C, humid atmosphere, and 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> for exactly 6 hours.
5. After 6 hours, transfer the contents of the wells into 15 mL centrifuge tubes (non-exposed and DHA-exposed).
6. Centrifuge at 800 g for 2 minutes.
7. Remove the supernatant.
8. Add 12 mL of RPMI (pre-warmed at 37°C) and resuspend the RBC pellet.
9. Centrifuge at 800 g for 5 minutes.
10. Remove the supernatant.
11. Add 1 mL of culture medium (pre-warmed to 37°C) and resuspend the RBCs.
12. Transfer the suspension into 2 new wells in the 48-well culture plate.
13. Maintain the 48-well culture plate in an incubator under these conditions: 37°C, humid atmosphere, and 5% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> for 66 hours.
14. Mix and transfer the culture from each well into a 1.5 mL microcentrifuge tube.
15. Centrifuge briefly (2000 rpm for 30 seconds).
16. Use 2 µL of the pellet and make a thin blood smear from both samples.
17. Fix the smears in methanol for 2 seconds and stain using Giemsa (section 6.2.6).



**6.6. In-vitro RSA<sup>0-3h</sup>**

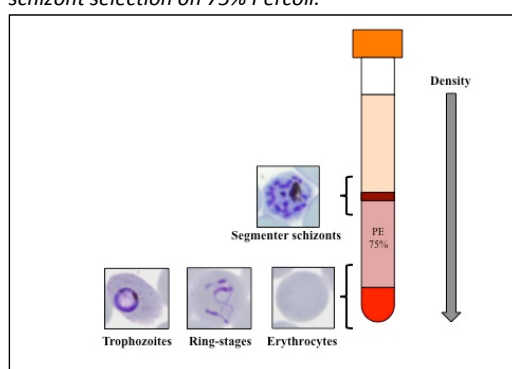
All steps are performed at RT unless otherwise stated. All procedures are performed in a level II biosafety cabinet to avoid bacterial contamination. **All *P. falciparum* samples are suitable for this assay, if the culture adaptation is successful.**

**6.6.1. Preparation of 0-3 hour post-invasion rings**

1. Use culture-adapted parasites (section 6.4) in a 25 cm<sup>2</sup> culture flask.
2. Allow the parasitemia to increase by changing the culture medium daily without adding uninfected RBCs.
3. Check the parasitemia daily; when it increases to 2-5%, transfer the culture to a 15 mL centrifuge tube.
4. Centrifuge at 800 g for 5 minutes.
5. Remove the supernatant.
6. Transfer the RBC pellet (~200 µL) to a 75 cm<sup>2</sup> culture flask containing 35 mL of culture medium (pre-warmed to 37°C) and 500 µL of uninfected RBCs.
7. Increase the parasitemia up to 4% by changing the culture medium daily.
8. When the proportion of rings is up to 50%, transfer the culture to a 50 mL centrifuge tube.
9. Centrifuge at 800 g for 5 minutes.
10. Remove the supernatant.
11. Add 10 volumes of 5% sorbitol (pre-warmed to 37°C) to the RBC pellet (1 volume).
12. Incubate 10 minutes at 37°C and vortex for 5 seconds.
13. Centrifuge at 800 g for 5 minutes.
14. Remove the supernatant.
15. Transfer the RBC pellet to a 75 cm<sup>2</sup> culture flask containing 35 mL of culture medium (pre-warmed to 37°C).
16. Repeat steps 9-15, 30-48 hours later (depending on parasite development and stages at the time of sorbitol treatment).
17. After 30 hours of culture, make a thin blood smear and stain with Giemsa.
  - If the proportion of mature schizonts (10-12 nuclei) is > 0.5%, go to step 18.
  - If the proportion of mature schizonts (10-12 nuclei) is < 0.5%, repeat step 16.
18. Transfer the culture suspension to a 50 mL centrifuge tube.
19. Centrifuge the culture suspension at 800 g for 5 minutes.
20. Remove the supernatant.
21. Transfer 400 µL of the pellet to a 15 mL centrifuge tube and return the remaining pellet to culture conditions.
22. Add 4 mL of heparinised RPMI (pre-warmed to 37°C) (section 6.2.5) to the 400 µL pellet and mix gently.
23. Incubate for 15 minutes at 37°C.
24. In a 15 mL centrifuge tube, add 4 mL of 75% Percoll solution at RT.
25. Carefully layer the 4 mL RBC suspension in heparinised RPMI on top of the 75% Percoll solution (slant the 15 mL centrifuge tube at a very low angle and slowly add the RBC suspension drop-wise along the wall of the tube using a transfer pipette). If this step is correctly performed, you will observe two separated phases: the infected RBC suspension at the top, and the Percoll 75% solution at the bottom.
26. Centrifuge at 1000 g for 15 minutes. You must observe an intermediate phase containing the mature schizonts (**see Figure 1**).
27. Collect this phase carefully and transfer it to a 15 mL tube.

28. Add up to 13 mL of RPMI (pre-warmed to 37°C). Mix by inverting the tube.
29. Centrifuge at 800 g for 5 minutes.
30. Remove the supernatant.
31. Using 0.5 µL of the pellet, make a thin smear, fix it with methanol, and stain it with Giemsa (section 6.2.6). Schizonts must be concentrated (> 10%). Ring stages must be rare (< 10%). While the slide is staining, proceed to steps 32-36.
32. Add 10 mL of culture medium (pre-warmed to 37°C) to the infected RBCs.
33. Add 200 µL of uninfected RBCs.
34. Transfer the RBC suspension to a 25 cm<sup>2</sup> flask.
35. Place in an incubator under these conditions: 37°C, humid atmosphere, 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> for exactly 3 hours.

**Figure 1:** Differential density of parasites of different stages enabling segmenting schizont selection on 75% Percoll.



**The following steps must be performed within 1 hour maximum.**

36. Mix the culture and transfer 0.5 mL into a 1.5 mL microcentrifuge tube.
37. Centrifuge 2000 rpm for 30 seconds.
38. Using 2 µL of the pellet make a thin smear, fix it with methanol, and stain it with Giemsa (rapid stain RAL555 is preferred since it will take < 1 minute).
39. Quickly evaluate the proportion of ring-stages (must be > 0.5%).
40. Transfer the culture suspension to a 15 mL centrifuge tube.
41. Centrifuge at 800 g for 5 minutes. Remove the supernatant.
42. Add 10 volumes of 5% sorbitol (pre-warmed to 37°C) to the RBC pellet (1 volume).
43. Incubate for 10 minutes at 37°C and vortex for 5 seconds.
44. Centrifuge at 800 g for 5 minutes. Remove the supernatant.

#### **6.6.2. Preparation of *P. falciparum* sample and drug solution**

- If parasitemia from step 39 is > 1%, add uninfected RBCs and culture medium (pre-warmed to 37°C) to obtain a 0.5-1% parasitemia and 2% hematocrit.
- Make a thin smear (= initial parasitemia, "INI").
- Prepare the DMSO control solution by adding 20 µL of DMSO to 2 mL of culture medium. Prepare the DHA test solution by adding 20 µL of DHA stock solution (section 6.2.2) to 2 mL of culture medium. Mix both solutions by vortexing.

- Do not re-use the thawed aliquot of DHA. Always use a fresh aliquot.

### 6.6.3. *In-vitro* RSA<sup>0-3h</sup>

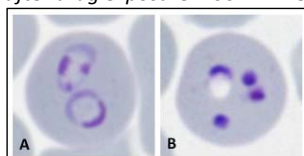
1. In a 48-well culture plate, add:
  - 100 µL of DMSO solution in the “non-exposed” well and
  - 100 µL of DHA solution in “DHA-exposed” well.
2. Add 900 µL of infected RBC suspension to each well.
3. Mix gently with a pipette while avoiding contact between wells.
4. Maintain the 48-well culture plate in an incubator under these conditions: 37°C, humid atmosphere, 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> for exactly 6 hours.
5. After 6 hours, transfer the contents of the wells to 15 mL centrifuge tubes (non-exposed and DHA-exposed).
6. Centrifuge at 800 g for 2 minutes.
7. Remove the supernatant.
8. Add 9 mL of RPMI (pre-warmed to 37°C). Resuspend the RBCs by inverting the tube.
9. Centrifuge at 800 g for 5 minutes.
10. Remove the supernatant.
11. Add 1 mL of culture medium (pre-warmed to 37°C) and mix to resuspend the RBCs.
12. Transfer the suspension into 2 new wells in the 48-well culture plate.
13. Maintain the 48-well culture plate in an incubator under the following conditions: 37°C, humid atmosphere, 5% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub> and 90% N<sub>2</sub> for 66 hours.
14. Mix and transfer the culture from each well into a 1.5 mL microcentrifuge tube.
15. Centrifuge at 2000 rpm for 30 seconds.
16. Use 2 µL of the pellet and make a thin blood smear from both samples.
17. Fix the smears in methanol for 2 seconds and stain with Giemsa (section 6.2.6).

### 6.7. Microscopic examination to determine parasite survival rates

Three different thin blood smears must be stained and read per assay:

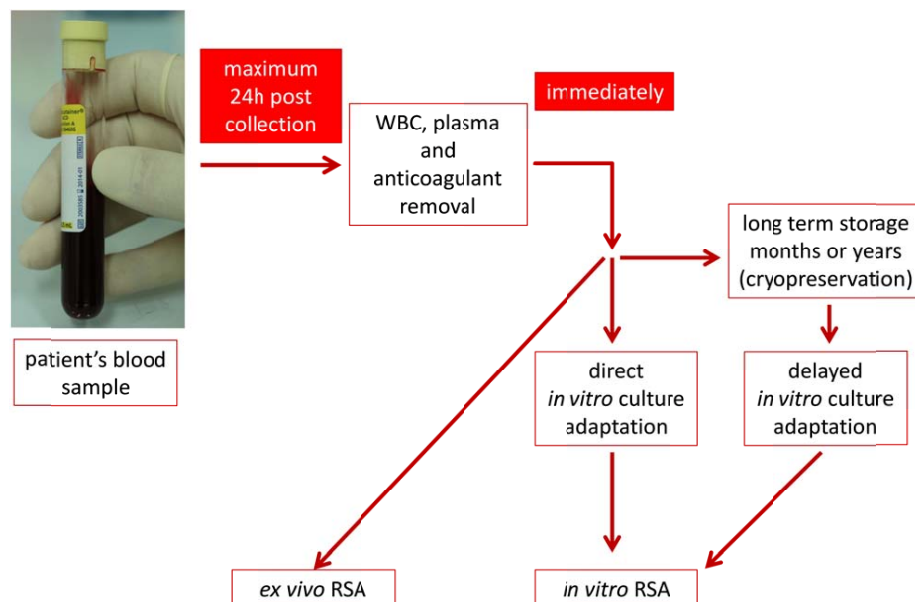
- “INI” smear to define the initial parasitemia at 0 hours
  - “NE” smear to define the non-exposed parasitemia at 72 hours
  - “DHA” smear to define the DHA-exposed parasitemia at 72 hours
1. At 100X magnification under immersion oil, count the number of infected RBCs containing viable parasites in a total of 10,000 RBCs (by estimating the number of RBCs per field or per grid). The smear must be homogenous: count areas on the slide containing 200-400 RBCs per field. Do not count areas at the edge of the smear since parasites will concentrate in these areas. Only viable parasites are scored (**see Figure 2**); vacuolated and pyknotic forms are not scored.
  2. Determine the proportion of viable parasites (% survival) in NE and DHA slides.
  3. Calculate:
    - Growth rate = NE/INI
    - Percentage survival (%) = (DHA/NE) x 100
  4. Percentage survival values are interpretable if growth rate:
    - $\geq 1$  for *ex-vivo* RSA
    - $\geq 1.5$  for *in-vitro* RSA<sup>0-3h</sup>

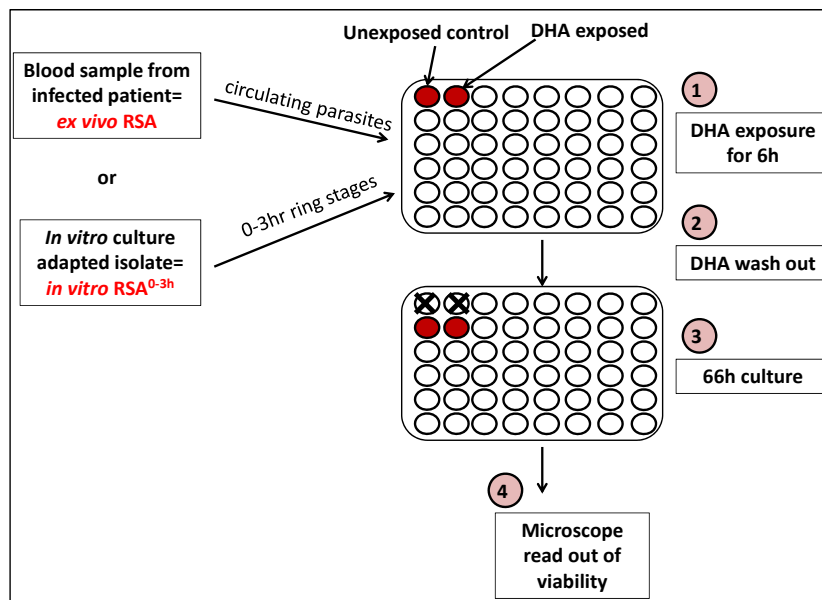
**Figure 2.** Microscopic differentiation of viable (A) and dead (B) parasites 72 hours after drug exposure. 100X immersion, Giemsa stain.



## 7. References

1. Witkowski, Amaratunga et al. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *Lancet Infect Dis.* 11 Sep 2013 [Epub ahead of print].

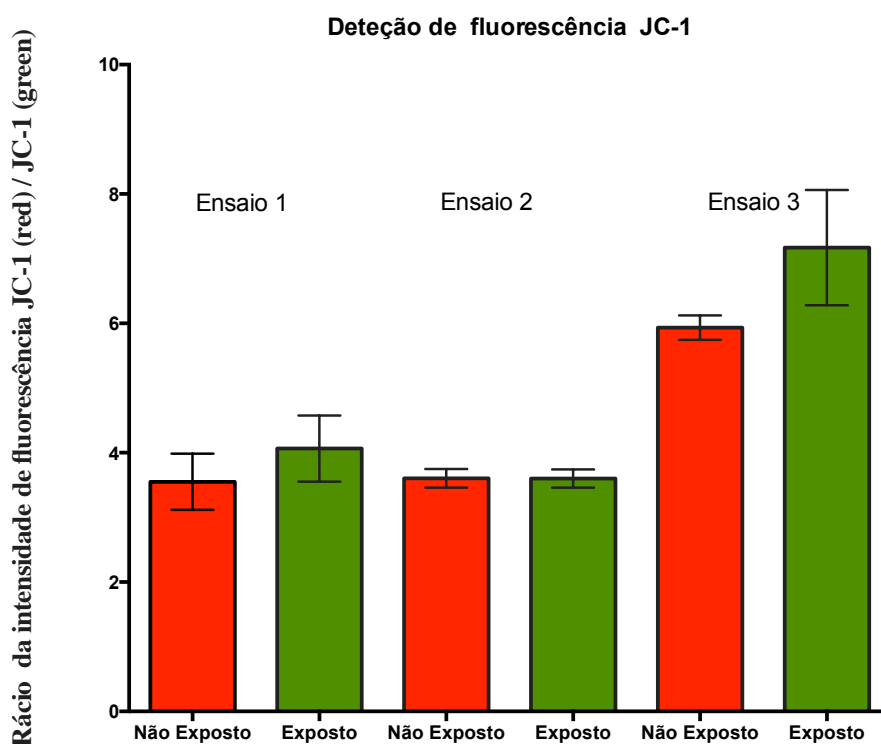
**Appendix A. Blood sample management for RSAs**

**Appendix B. Schematic representation of RSAs**

### DADOS RELATIVOS AO CORANTE JC-1

Para quantificar a sobrevivência dos parasitas quando tratados com DHA, expressa pela  $\Delta\Psi_m$  foi determinado o rácio JC-1 vermelho/ JC-1 verde da fluorescência emitida a  $\sim 525\text{nm}$  (verde) e  $\sim 590\text{nm}$  (vermelho) (figura 1). Quanto maior o rácio maior a viabilidade da população de parasitas. Analisando os três ensaios é possível constatar que não existe uma diferença estatisticamente significativa (teste Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ) de viabilidade/sobrevivência entre culturas não expostas e o das culturas expostas estimada pelo JC-1.

A viabilidade dos parasitas estimada usando JC-1 é superior à estimada por MO.



**Figura A-II – Variação do potencial de membrana mitocondrial representada pelo rácio da intensidade de fluorescência JC-1 red/ JC-1 green.** A - No gráfico são comparados os rácios das culturas não tratadas (barra vermelha) e tratadas com 700 nM de DHA durante 6 horas (barra verde), de três ensaios distintos com 6 réplicas cada. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SD.

## Teste Mann-Whitney

Table Analyzed	Fluorescência JC-1 - Rácio JC-1 RED/ JC-1 GREEN
Column D	DHA
vs.	vs.
Column C	C
Mann Whitney test	
P value	0.6753
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column C,D	42 , 36
Mann-Whitney U	15
Difference between medians	
Median of column C	3.709, n=6
Median of column D	3.591, n=6
Difference: Actual	-0.1183
Difference: Hodges-Lehmann	-0.09974

Table Analyzed	Fluorescência JC-1 - Rácio JC-1 RED/ JC-1 GREEN
Column B	DHA
vs.	vs.
Column A	C
Mann Whitney test	
P value	0.3874
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	33 , 45
Mann-Whitney U	12
Difference between medians	
Median of column A	3.579, n=6
Median of column B	3.856, n=6
Difference: Actual	0.2773
Difference: Hodges-Lehmann	0.2773

Table Analyzed	Fluorescência JC-1 - Rácio JC-1 RED/ JC-1 GREEN
Column F	DHA
vs.	vs.
Column E	C
Mann Whitney test	
P value	0.5714
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column E,F	35 , 43
Mann-Whitney U	14
Difference between medians	
Median of column E	5.904, n=6
Median of column F	6.642, n=6
Difference: Actual	0.7381
Difference: Hodges-Lehmann	0.7372



## DADOS RELATIVOS AO INTERCALANTE DE DNA SYBR GREEN I

## Teste Mann-Whitney

Table Analyzed	Fluorescência SYBR Green I
Column D	DHA
vs.	vs.
Column C	C
Mann Whitney test	
P value	0.0022
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column C,D	57 , 21
Mann-Whitney U	0
Difference between medians	
Median of column C	3.569e+006, n=6
Median of column D	279557, n=6
Difference: Actual	-3.290e+006
Difference: Hodges-Lehmann	-3.300e+006

Table Analyzed	Fluorescência SYBR Green I
Column F	DHA
vs.	vs.
Column E	C
Mann Whitney test	
P value	0.0022
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column E,F	57 , 21
Mann-Whitney U	0
Difference between medians	
Median of column E	4.487e+006, n=6
Median of column F	256180, n=6
Difference: Actual	-4.231e+006
Difference: Hodges-Lehmann	-4.195e+006

Table Analyzed	Fluorescência SYBR Green I
Column B	DHA
vs.	vs.
Column A	C
Mann Whitney test	
P value	0.0022
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	57 , 21
Mann-Whitney U	0
Difference between medians	
Median of column A	3.457e+006, n=6
Median of column B	314959, n=6
Difference: Actual	-3.142e+006
Difference: Hodges-Lehmann	-3.122e+006

**Comparação SYBER Green I e Microscopia Ótica****SYBR Green I**

	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3	
	C	DHA	C	DHA	C	DHA
	3894951	237673	3994533	296467	4380651	264672
	4146629	266853	4482892	296218	5197515	278917
	3761202	317676	3506504	289274	4673286	247688
	2667728	431089	2992996	256541	4295958	359167
	3152254	370679	3287980	241808	4593776	225171
	2485690	312242	3631610	269839	3042819	229505
média	3351409	322702	3649419,167	275024,5	4364000,833	267520
desvio padrão	685900,1192	70047,4813	528403,6484	22732,6134	720226,1172	49333,6834
%sobrevivência SGI	9,628845659		7,536117049		6,13015465	
%sobrecivência MO	2,459		1,034		1,379	
racio SGI/MO	3,915756673		7,288314361		4,445362328	
média do rácio	5,216477787					
desvio padrão rácio	1,813698053					

## DADOS RELATIVOS AO CORANTE RODAMINA 123

## Teste Mann-Whitney

Table Analyzed	Fluorescência Rh 123
Column B	DHA
vs.	vs.
Column A	C
Mann Whitney test	
P value	0.0022
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	57 , 21
Mann-Whitney U	0
Difference between medians	
Median of column A	2.136e+006, n=6
Median of column B	1.153e+006, n=6
Difference: Actual	-983753
Difference: Hodges-Lehmann	-883528
Table Analyzed	Fluorescência Rh 123
Column D	DHA
vs.	vs.
Column C	C
Mann Whitney test	
P value	0.0043
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column C,D	56 , 22
Mann-Whitney U	1
Difference between medians	
Median of column C	2.146e+006, n=6
Median of column D	1.271e+006, n=6
Difference: Actual	-874157
Difference: Hodges-Lehmann	-929070
Table Analyzed	Fluorescência Rh 123
Column F	DHA
vs.	vs.
Column E	C
Mann Whitney test	
P value	0.0022
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column E,F	57 , 21
Mann-Whitney U	0
Difference between medians	
Median of column E	3.859e+006, n=6
Median of column F	1.918e+006, n=6
Difference: Actual	-1.941e+006
Difference: Hodges-Lehmann	-2.031e+006

## Comparação rodamina 123 e Microscopia Ótica

Rh123

	Ensaio 1		Ensaio 2		Ensaio 3	
	C	DHA	C	DHA	C	DHA
	1791858	1049511	2918797	1172264	2861904	1446987
	2316314	1113977	2889145	1614101	4283729	1921770
	2246894	1191238	2162831	987622	3580393	1573384
	2270692	1110934	2128349	1326346	3677114	1986004
	1915635	1521374	1750385	1216520	4040273	1914006
	2025826	1345962	2066067	1826499	4255225	2561708
média	2094536,5	1222166	2319262,333	1357225,33	3783106,333	1900643,17
desvio padrão	215299,7823	178714,624	475994,9643	309118,659	536767,0991	389312,361
%sobrevivência SGI	58,35018869		58,51969886		50,24027873	
%sobrecivência MO	2,459		1,034		1,379	
racio SGI/MO	23,72923493		56,59545345		36,43239937	
média do rácio	38,91902925					
desvio padrão rácio	16,57361083					

## Regressão Linear Rh123

Linear reg. Tabular results	A	B
	Curva 1	Curva 2
	Y	Y
Best-fit values		
Slope	66506 ± 27294	51241 ± 17648
Y-intercept when X=0.0	715207 ± 29546	440458 ± 19104
X-intercept when Y=0.0	-10.75	-8.596
1/slope	1.504e-005	1.952e-005
95% Confidence Intervals		
Slope	8643 to 124369	13827 to 88654
Y-intercept when X=0.0	652569 to 777845	399957 to 480959
X-intercept when Y=0.0	-86.96 to -5.430	-33.57 to -4.674
Goodness of Fit		
R square	0.2707	0.3451
Sy.x	102421	66225
Is slope significantly non-zero?		
F	5.937	8.430
DFn, DFd	1.000, 16.00	1.000, 16.00
P value	0.0269	0.0104
Deviation from zero?	Significant	Significant
Data		
Number of X values	6	6
Maximum number of Y replicates	3	3
Total number of values	18	18
Number of missing values	0	0

**DADOS RELATIVOS AO CORANTE RESAZURINA****Tabela V. 1** – Comparação da % de sobrevivência calculada em placa transparente e placa negra, para as estirpes 3D7 e 1240 de *P. falciparum*.

	3D7			1240		
	Microscópio	RZN T*	RZN P* <sup>1</sup>	Microscópio	RZN T*	RZN P* <sup>1</sup>
% sobrevivência	0,3	18,4	21,1	1,7	42,3	49,7
% sobrevivência	0,8	27,4	30,3	0,6	42,2	47,9
% sobrevivência	0,5	11,6	15,3	2,6	27,6	39,3
Média % sobrevivência	0,53	19,13	22,23	1,63	37,37	45,63
Desvio padrão	0,25	7,93	7,56	1,00	8,46	5,56
<i>p-value</i>		0,7			0,4	
<i>r</i>		1			1	

\* Leitura da fluorescência da RZN em placa transparente; \*<sup>1</sup>Leitura da fluorescência da RZN em placa preta.

Existe uma correlação positiva perfeita (correlação de Spearman,  $r=1$ ) entre as percentagens de sobrevivência calculadas através da intensidade de fluorescência lida em placa transparente e placa preta, tanto para a estirpe 3D7 de *P. falciparum* como para a estirpe 1240 da mesma espécie. Não existe uma diferença estatisticamente significativa entre as percentagens de sobrevivência calculadas pelas duas placas (teste Mann-Whitney,  $p>0,05$ ).

Mann-Whitney test	
Table Analyzed	placa transparente 3d7 vs 1240
Column D	RZN 1240
vs.	vs.
Column B	RZN 3D7
Mann Whitney test	
P value	0.4857
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	ns
Significantly different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column B,D	15 , 21
Mann-Whitney U	5
Difference between medians	
Median of column B	21.73, n=4
Median of column D	32.30, n=4
Difference: Actual	10.58
Difference: Hodges-Lehmann	9.185

## Teste Mann-Whitney

Mann-Whitney test	
Table Analyzed	Fluorescência RZN - 1240
Column B	DHA
vs.	vs.
Column A	C
Mann Whitney test	
P value	0.0022
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column A,B	57 , 21
Mann-Whitney U	0
Difference between medians	
Median of column A	769285, n=6
Median of column B	605052, n=6
Difference: Actual	-164233
Difference: Hodges-Lehmann	-175113

Mann-Whitney test	
Table Analyzed	Fluorescência RZN - 3D7
Column F	DHA
vs.	vs.
Column E	C
Mann Whitney test	
P value	0.0022
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column E,F	57 , 21
Mann-Whitney U	0
Difference between medians	
Median of column E	1.073e+006, n=6
Median of column F	832578, n=6
Difference: Actual	-240757
Difference: Hodges-Lehmann	-235117

Mann-Whitney test	
Table Analyzed	Fluorescência RZN - 3D7
Column D	DHA
vs.	vs.
Column C	C
Mann Whitney test	
P value	0.0022
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column C,D	57 , 21
Mann-Whitney U	0
Difference between medians	
Median of column C	917603, n=6
Median of column D	726755, n=6
Difference: Actual	-190849
Difference: Hodges-Lehmann	-186853

Mann-Whitney test	
Table Analyzed	Fluorescência RZN - 1240
Column D	DHA
vs.	vs.
Column C	C
Mann Whitney test	
P value	0.0022
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column C,D	57 , 21
Mann-Whitney U	0
Difference between medians	
Median of column C	780619, n=6
Median of column D	726103, n=6
Difference: Actual	-54516
Difference: Hodges-Lehmann	-54516

## ANEXO V

Mann-Whitney test	
Table Analyzed	Fluorescência RZN - 1240
Column F	DHA
vs.	vs.
Column E	C
Mann Whitney test	
P value	0.0022
Exact or approximate P value?	Exact
P value summary	**
Significantly different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Sum of ranks in column E,F	57 , 21
Mann-Whitney U	0
Difference between medians	
Median of column E	1.005e+006, n=6
Median of column F	809468, n=6
Difference: Actual	-195886
Difference: Hodges-Lehmann	-190832